

Aus dem Institut für Anatomie
(Leiter: Prof. Dr. Hans-Joachim Merker)
des Fachbereiches natur- und sozialwissenschaftliche
Grundlagenmedizin und medizinische Ökologie
der Freien Universität Berlin

**Untersuchung über die
morphologischen und quantitativen Veränderungen
von humanen KB-Tumorzellen nach Behandlung mit
Vanadocen-dichlorid, Titanocen-dichlorid
und cis-Diammindichloroplatin (II)**

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnärztin Ina Nitschke
aus Berlin

1984

Aus dem Institut für Anatomie
(Leiter: Prof. Dr. Hans-Joachim Merker)
des Fachbereiches natur- und sozialwissenschaftliche
Grundlagenmedizin und medizinische Ökologie
der Freien Universität Berlin

Untersuchung über die
morphologischen und quantitativen Veränderungen
von humanen KB-Tumorzellen nach Behandlung mit
Vanadocen-dichlorid, Titanocen-dichlorid
und cis-Diammindichloroplatin(II)

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnärztin Ina Nitschke
aus Berlin

Referent: Privat-Dozentin Dr. Petra Köpf-Maier

Korreferent: Professor Dr. Dr. Rudolf Stellmach

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches Zahn-,
Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 28. Juni 1984

Meinen lieben Eltern

1	Elektronenphysikalische Untersuchungen	3.8
2	Lichtphysikalische Untersuchungen	10.5
3	Magnetische Untersuchungen	3.1
4	Zusammenfassung und Zusammenfassung	10.1
5	Einleitung	3.3
6	Einleitung	3.3
7	Einleitung	3.3
8	Einleitung	3.3
9	Einleitung	3.3
10	Einleitung	3.3
11	Einleitung	3.3
12	Einleitung	3.3
13	Einleitung	3.3
14	Einleitung	3.3
15	Einleitung	3.3
16	Einleitung	3.3
17	Einleitung	3.3
18	Einleitung	3.3
19	Einleitung	3.3
20	Einleitung	3.3
21	Einleitung	3.3
22	Einleitung	3.3
23	Einleitung	3.3
24	Einleitung	3.3
25	Einleitung	3.3
26	Einleitung	3.3
27	Einleitung	3.3
28	Einleitung	3.3
29	Einleitung	3.3
30	Einleitung	3.3
31	Einleitung	3.3
32	Einleitung	3.3
33	Einleitung	3.3
34	Einleitung	3.3
35	Einleitung	3.3
36	Einleitung	3.3
37	Einleitung	3.3
38	Einleitung	3.3
39	Einleitung	3.3
40	Einleitung	3.3
41	Einleitung	3.3
42	Einleitung	3.3
43	Einleitung	3.3
44	Einleitung	3.3
45	Einleitung	3.3
46	Einleitung	3.3
47	Einleitung	3.3
48	Einleitung	3.3
49	Einleitung	3.3
50	Einleitung	3.3
51	Einleitung	3.3
52	Einleitung	3.3
53	Einleitung	3.3
54	Einleitung	3.3
55	Einleitung	3.3
56	Einleitung	3.3
57	Einleitung	3.3
58	Einleitung	3.3
59	Einleitung	3.3
60	Einleitung	3.3
61	Einleitung	3.3
62	Einleitung	3.3
63	Einleitung	3.3
64	Einleitung	3.3
65	Einleitung	3.3
66	Einleitung	3.3
67	Einleitung	3.3
68	Einleitung	3.3
69	Einleitung	3.3
70	Einleitung	3.3
71	Einleitung	3.3
72	Einleitung	3.3
73	Einleitung	3.3
74	Einleitung	3.3
75	Einleitung	3.3
76	Einleitung	3.3
77	Einleitung	3.3
78	Einleitung	3.3
79	Einleitung	3.3
80	Einleitung	3.3
81	Einleitung	3.3
82	Einleitung	3.3
83	Einleitung	3.3
84	Einleitung	3.3
85	Einleitung	3.3
86	Einleitung	3.3
87	Einleitung	3.3
88	Einleitung	3.3
89	Einleitung	3.3
90	Einleitung	3.3
91	Einleitung	3.3
92	Einleitung	3.3
93	Einleitung	3.3
94	Einleitung	3.3
95	Einleitung	3.3
96	Einleitung	3.3
97	Einleitung	3.3
98	Einleitung	3.3
99	Einleitung	3.3
100	Einleitung	3.3

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
Erklärung der verwendeten Abkürzungen	8
1. Aufgabenstellung	9
2. Bisheriger Kenntnisstand	10
2.1 Erkenntnisse über Vanadocen-dichlorid und Titanocen-dichlorid	10
2.1.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung	10
2.1.2 In-vitro-Untersuchungen im Vergleich zu in-vivo-Studien	12
2.1.3 Erkenntnisse über die morphologischen Veränderungen	14
2.1.4 Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus	17
2.2 Erkenntnisse über cis-Diammindichloro-platin(II)	18
2.2.1 Kurzer historischer Überblick	18
2.2.2 Erkenntnisse über die morphologischen Veränderungen	19
2.2.3 Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus	22
2.2.4 Anwendung im klinischen Bereich	22
3. Material und Methoden	25
3.1 Zellen	25
3.2 Züchtung der Zellkulturen	26
3.3 Substanzen und Substanzexposition	27
3.4 Wachstumsverhalten - Avitalitätsindex	30
3.5 Lichtmikroskopische Untersuchungen	31
3.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	33

4.	Befunde	36
4.1	Wachstumsverhalten	36
4.1.1	Grundlagen	36
4.1.2	Wachstumsverhalten der Kontrollzellen	38
4.1.3	Wachstumsverhalten nach Gabe von DDP	39
4.1.4	Wachstumsverhalten nach Gabe von TDC	42
4.1.5	Wachstumsverhalten nach Gabe von VDC	45
4.2	Avitalitätsindex	48
4.2.1	Avitalitätsindex - Sterberate	48
4.2.2	Avitalitätsindex der Kontrollzellen	48
4.2.3	Avitalitätsindex nach Gabe von DDP	48
4.2.4	Avitalitätsindex nach Gabe von TDC	50
4.2.5	Avitalitätsindex nach Gabe von VDC	54
4.3	Lichtmikroskopische Befunde	56
4.3.1	Normalstruktur der KB-Zellen	56
4.3.2	Struktur der KB-Zellen nach VDC-Behandlung	58
4.3.3	Struktur der KB-Zellen nach TDC- und DDP-Behandlung	67
4.4	Elektronenmikroskopische Befunde	69
4.4.1	Normalstruktur der KB-Zellen	69
4.4.2	Struktur der KB-Zelle nach Behandlung mit Metalloccen-dihalogeniden	76
4.4.2.1	Strukturveränderung nach Gabe einer 10^{-6} M VDC-Lösung	76
4.4.2.2	Strukturveränderung nach Gabe einer 10^{-5} M VDC-Lösung	81
4.4.2.3	Strukturveränderung nach Gabe einer 5×10^{-5} M TDC-Lösung	85

4.4.2.4	Strukturveränderung nach Gabe einer 5×10^{-4} M TDC-Lösung	88
4.4.2.5	Strukturveränderung nach Gabe einer 5×10^{-7} M DDP-Lösung	90
4.4.2.6	Strukturveränderung nach Gabe einer 5×10^{-6} M DDP-Lösung	92

5.	Diskussion	111
----	------------	-----

5.1	Diskussion des Wachstumsverhaltens und der Zelltoxizität	111
-----	--	-----

5.2	Diskussion der morphologischen Veränderungen	116
-----	--	-----

5.2.1	Veränderung des Kernes	116
-------	------------------------	-----

5.2.2	Veränderungen der Mitochondrien	118
-------	---------------------------------	-----

5.2.3	Auftreten von Mikrotubuli	120
-------	---------------------------	-----

5.2.4	Veränderungen am rauen endoplasmatischen Retikulum	121
-------	--	-----

5.2.5	Auftreten von virusähnlichen Partikeln	122
-------	--	-----

6.	Zusammenfassung	124
----	-----------------	-----

7.	Literaturverzeichnis	127
----	----------------------	-----

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung der verwendeten Abkürzungen

DDP	cis-Diammindichloroplatin(II), Strukturformel S. 28
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAT	Ehrlich-Aszites-Tumor
FKS	Fötales Kälberserum
HDC	Hafnocen-dichlorid
M	molar, molare
MDC	Molybdenocen-dichlorid
MEM	Minimum Essential Medium
p.t.t.	post transplantationem tumoris
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
TDC	Titanocen-dichlorid, Strukturformel S. 28
V	Vergrößerung (bezogen auf Originalarbeit-DIN A 4-)
VDC	Vanadocen-dichlorid, Strukturformel S. 28
ZDC	Zirconocen-dichlorid

1. AUFGABENSTELLUNG

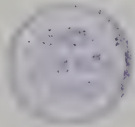
Seit einigen Jahren wird die anorganische Verbindung cis-Diammindichloroplatin(II) in der Klinik als Chemotherapeutikum gegen maligne Tumoren insbesondere des Urogenitaltraktes und des Hals-Kopf-Bereiches eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit sollte experimentell geprüft werden, ob auch metallorganische Komplexe vom Typ der Metallocen-dichloride zellwachstumshemmende "zytostatische" Eigenschaften haben und damit möglicherweise neuartige Zytostatika darstellen.

Die Untersuchungen erfolgten in vitro an humanen Tumorzellen, wobei neben der Applikation von cis-Diammindichloroplatin(II) und Titanocen-dichlorid die Einwirkung von Vanodocen-dichlorid auf die Zellen im Vordergrund stand.

Aufgabe dieser Arbeit war es, mit Hilfe von Wachstumsreihen zu zeigen, ob die zu untersuchenden Substanzen einen zellwachstumshemmenden Effekt haben, wobei die Wirkung in Abhängigkeit von der Konzentration zu relativieren war. Hierzu wurde neben den Wachstumskurven auch der Avitalitätsindex bestimmt.

Weiterhin sollte die Arbeit die morphologischen Zellveränderungen in Abhängigkeit von der Substanz und der jeweiligen Konzentration aufzeigen. Zu diesem Zweck wurden sowohl lichtmikroskopische als auch elektronenmikroskopische Studien durchgeführt.



2. BISHERIGER KENNTNISSTAND

2.1 Erkenntnisse über Vanadocen-dichlorid (VDC) und Titanocen-dichlorid (TDC)

1979 wurde das erstmals von KÖPF-MAIER und KÖPF^{19,20} auf die tumorhemmende Wirkung metallorganischer Komplexe vom Typ der Metalloccen-dichloride hingewiesen (TDC - das erste Metalloccen mit cancerostatischer Wirksamkeit, VDC - ein weiteres Antitumor-Agens aus der Metalloccenreihe). In den folgenden Jahren wurden dann zahlreiche Untersuchungen von KÖPF-MAIER et al.¹⁹⁻³³ durchgeführt, die der Aufklärung der Struktur-Wirkungs-Beziehung, der Unterschiede zwischen dem in-vivo- und in-vitro-Verhalten, der morphologischen Veränderungen sowie des Wirkungsmechanismus dienen sollten.

2.1.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung

Um Hinweise auf die Struktur-Wirkungs-Beziehung zu erhalten, wurden die Metalloccen-dihalogenide an drei Stellen ihres Molekülgerüsts verändert und auf ihre zytostatische Wirkung überprüft.

Variation des Zentralmetalls

In-vivo-Versuche an Ehrlich-Aszites-Tumor-tragenden CF1-Mäusen (Köpf-Maier et al.²²) zeigten, daß Zirconocen-dichlorid (ZDC) und Hafnocen-dichlorid (HDC) keine erkennbaren tumorhemmenden Eigenschaften aufweisen. Bei niedrigen Dosen starben die Tiere ausschließlich durch Manifestation des Tumors, bei höheren Dosen verstarben die Mäuse aufgrund der Substanztoxizität. Ein Stadium der Heilung oder Lebensverlängerung wurde bei ZDC und HDC nicht verzeichnet.

Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungsergebnisse des TDC, das wie ZDC und HDC als Zentralmetall ein Element aus der IV. Nebengruppe enthält. Nach Behandlung von tumortragenden Mäusen mit einer optimalen therapeutischen Dosis von TDC stieg die mittlere Überlebensdauer um 900 %, d.h. 80-90 % der Tiere überlebten nach Gabe von 30-60 mg/kg TDC bis zum 180. Tag p.t.t. ohne Tumormanifestation. Neben den Heilungsfällen standen sich in Abhängigkeit von der applizierten Dosis Tumortodesfälle (bei 10 mg/kg starben ca. 90 % der Tiere) und Toxizitätstodesfälle (über 70 mg/kg starben die Tiere zwischen dem 1. und 6. Tag p.t.t.) gegenüber (KÖPF-MAIER²²). Beim Vanadocen-dichlorid (VDC) ließ sich im Dosisbereich von 80-90 mg/kg eine 100%ige Heilungsquote erreichen, d.h. keine der behandelten CF1-Mäuse erkrankte am zuvor transplantierten Ehrlich-Aszites-Tumor. Der gut wirksame Dosisbereich liegt damit etwas höher als beim TDC (KÖPF-MAIER und KÖPF²⁰).

Weiterhin wurden Metalloce-n-dichloride mit den Elementen Nb, Mo, Ta und W als Zentralatom eingesetzt, wobei in optimalen Dosisbereichen die Niob (Nb) oder Molybdän (Mo) enthaltenden Komplexe durch Heilungsraten bis zu 100 % ausgezeichnet waren, während die Tantal- und Wolframverbindungen nur noch sporadisch zytostatische Effekte aufwiesen (KÖPF-MAIER et al.^{21, 24, 25}).

Es ist darauf hinzuweisen, daß die Substanzapplikationen nicht nur 24 Stunden p.t.t., sondern auch noch nach 2, 3, 4, 5, 6 und 7 Tagen p.t.t. erfolgten. Die Überlebensraten nahmen bis zur Behandlung am 7. Tag p.t.t. stark ab, wobei bei späten Behandlungstagen das TDC die höchste Überlebensrate aufwies. Das TDC scheint demnach bei fortgeschrittenem Tumor dem VDC überlegen zu sein.

Die bis dahin erfolgten in-vivo-Tests wurden an EAT-tragenden Mäusen durchgeführt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Ergebnisse auch auf andere Tumorsysteme übertragbar sind. KÖPF-MAIER et al.²⁷ verwendeten dazu standardisierte Leukämietumoren.

Variation der Halogenliganden

1980 konnten KÖPF-MAIER et al.²⁴ an Titanocen-dihalogeniden zeigen, daß die Veränderung der Halogen-Liganden (F, Cl, Br, I, N₃, NCS) im Molekülgerüst keinen wesentlichen Einfluß auf die tumorhemmende Aktivität hatten.

Variation am Cyclopentadienyl-Liganden

Die dritte Möglichkeit einer Modifikation des Metallocen-dihalogenids besteht in der Variation der Cyclopentadienyl-Liganden. Hierzu wurden monosubstituierte sowie überbrückte oder symmetrische 1,1-disubstituierte Abkömmlinge des TDC synthetisiert und auf ihre Antitumoraktivität hin untersucht. Es zeigte sich, daß die zytostatischen Eigenschaften mit steigender Zahl modifizierter Cyclopentadienylringe abnahmen. Es ist anzunehmen, daß den Cyclopentadienylringen Carriereigenschaften zuzuschreiben sind, d.h. sie verhelfen der Substanz, ihren Wirkungsort zu erreichen, so daß bei Veränderung des Moleküls an dieser Stelle das Transportverhalten beeinflusst wird (KÖPF-MAIER et al.²⁶).

2.1.2 In-vitro-Untersuchungen im Vergleich zu in-vivo-Studien

1979 wurden von KÖPF-MAIER und Mitarbeitern Untersuchungen durchgeführt, die Aufschluß über die Unterschiede der Wirkung von Metallocen-dihalogeniden in vitro und in vivo gaben. Es wurden hierfür Permanentzellkulturen angelegt; bei den Zellen handelte es sich wie bei den in-vivo-Versuchen um Ehrlich-Aszites-Tumorzellen. Die Zellen wurden ursprünglich einer CF1-Maus, die den Tumor acht Tage lang trug, entnommen und dann in einer Suspensionskultur in vitro weitergezüchtet.

Es wurden zum einen der zytotoxische Effekt durch das Erstellen eines Avitalitätsindex, zum anderen die Dosis-

Wirkungs-Beziehung mit Hilfe von Wachstumskurven ermittelt.

Untersucht wurden nicht nur die Substanzen TDC und VDC, sondern auch die Substanzen ZDC, HDC und MDC, die ebenfalls schon bei in-vivo-Versuchen Beachtung gefunden hatten. Die Substanzgabe erfolgte bei jeder Substanz in zwölf Konzentrationsschritten, und zwar in den Stufen 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M usw. bis zu 10^{-7} M.

Es zeigte sich, daß VDC am stärksten zellwachstumshemmend war und das Zellwachstum schon bei einer Konzentration von 5×10^{-6} M beeinflusste. Bei Substanzkonzentrationen von 10^{-5} M und 5×10^{-5} M wurden die wachstumshemmenden Effekte deutlicher, während bei einer Konzentration von 10^{-4} M und höher schließlich eine völlige Einstellung des Zellwachstums resultierte. Um die gleiche Wirkung von VDC zu erreichen, mußten TDC und MDC in höheren Konzentrationen angewendet werden. Der völlige Wachstumsstillstand bei beiden Substanzen erfolgte ab einer Konzentration von 5×10^{-3} M. Signifikante Abnahmen des Zellwachstums erfolgten bei Konzentrationen von 5×10^{-4} M bzw. bei 10^{-3} M. Es konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, daß im Gegensatz zu den in-vivo-Tests in der Zellkultur das VDC dem TDC überlegen ist. Möglicherweise ist diese Differenz zwischen in-vitro- und in-vivo-Verhalten mit dem Einfluß immunologischer Faktoren zu erklären.

Weiterhin wurde überprüft, ob ZDC und HDC ähnlich wie in den in-vivo-Versuchen keine wachstumshemmende Wirkung haben. In Übereinstimmung mit diesen in-vivo-Befunden ließ sich in vitro ein zytostatischer Effekt erst bei sehr hoher Konzentration (5×10^{-3} M) erkennen, so daß anzunehmen ist, daß es sich hierbei mehr um einen unspezifischen Effekt als um einen spezifisch zytostatischen Effekt handelt.

Weiterhin erfolgte im Rahmen dieser in-vitro-Untersuchung die Bestimmung des Avitalitätsindex durch eine "Vitalfärbung" der behandelten Zellen mit Lissamingrün, wobei die Behandlung der EAT-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von TDC und VDC erfolgte. Nach Applikation einer 5×10^{-3} -molaren TDC-Lösung waren 72 Stunden nach Beendigung der Substanzexposition 80 % der Zellen avital. Für die mittlere Konzentration (5×10^{-5} M) hingegen starben 37 % der Zellen.

Nach VDC-Behandlung lagen die Avitalitätsindizes höher als beim TDC: Der Avitalitätsindex bei der niedrigsten Konzentration (10^{-6} M) betrug beim 72h-Wert 48 % und bei der mittleren Konzentration (10^{-5} M) 55 %. Die Sterberate bei der hochkonzentrierten Lösung (10^{-4} M) lag mit 95 % höher als die der mit TDC behandelten Kulturen.

Vergleichend ist zu erwähnen, daß bei den unbehandelten Kontrollzellen weniger als 1 % der Zellen starben (KÜPF-MAIER et al.^{25, 28}).

2.1.3 Erkenntnisse über die morphologischen Veränderungen

Bei den bisher durchgeführten Untersuchungen stand nicht nur das Wachstumsverhalten im Vordergrund, sondern auch die strukturellen Umwandlungen der Zelle nach Substanzgabe. Diese morphologischen Veränderungen wurden weiterhin mit denen nach einer DDP-Behandlung verglichen, in der Hoffnung, einen Hinweis auf mögliche Ähnlichkeiten oder Unterschiede im Wirkungsmechanismus zu erhalten. Diese morphologischen Studien wurden wiederum am EAT-System der Maus durchgeführt.

Lichtmikroskopische Ergebnisse

Besonders auffällig im Lichtmikroskop war das veränderte Mitose-Verhalten der Zellen. Bereits 3 Stunden nach der Beendigung der VDC-bzw. TDC-Applikation waren abnorme Mitosefiguren zu erkennen. Im Zeitraum zwischen 10 und 96 Stunden ließen sich nach VDC-Behandlung viele drei- und vierpolare Mitosen finden, wobei die Aufteilung der Chromosomen auf die Pole häufig nicht gleichmäßig erfolgte.

Sowohl beim VDC als auch beim TDC war selbst bei bipolaren Mitosen eine ungleichmäßige Verteilung des Chromosomenmaterials auf die zwei Zellpole zu beobachten. Weiterhin zeigte sich, daß nach durchlaufener Metaphase in der Anaphase einige Chromosomen im Bereich des Zelläquators liegenblieben bzw. später mit Verzögerung polwärts wanderten. Neben diesen Mitoseanomalien waren auch direkte Durchschnürungen des Zellkerns zu beobachten, ohne daß Chromosomen in Erscheinung traten. Diese Amitosen waren jedoch häufiger mehr nach TDC- als nach VDC-Gabe zu sehen. 3 Stunden nach Applikation von TDC befanden sich nur 0,5 ‰ der Zellen in Amitose, 10-12 Stunden später hingegen bereits 8-9 ‰.

6 Stunden nach VDC-Behandlung fingen die Zellen an, sich zu vergrößern, nach 12-24 Stunden wurde der Kern auffälliger, und es ließen sich teilweise Zellen mit zwei oder drei Nucleoli entdecken, während unbehandelte EAT-Zellen im allgemeinen nur einen Nucleolus besaßen. Im Gegensatz dazu zeigte sich 10 Stunden nach TDC-Behandlung bei vielen Zellen eine sich über den gesamten Kern erstreckende Chromatinklumpung, gefolgt von Zellschrumpfung und Nekrose. Die Kernsubstanz verdichtete sich stark. Außerdem traten Makrophagen, Leuko- und Lymphozyten auf, die dann nach 96 Stunden 80 % aller im Aszites vorhandenen Zellen ausmachten.

Im Zeitraum zwischen 24 und 96 Stunden waren besonders nach TDC-Behandlung Riesenzellen zu sehen, die nach 72 Stunden ca. 28 % der Tumorzellen ausmachten und sich später wieder verringerten. Die unterschiedlichen Strukturen und Größenverhältnisse ließen sich gut mit dem Lichtmikroskop darstellen. Zu sehen waren zum einen mehrkernige, d.h. teilweise bis zu acht unterschiedlich große Nuclei enthaltende Zellen, zum anderen einkernige Riesenzellen, die sowohl durch einen vergrößerten Kern als auch durch einen erheblich vergrößerten Zelldurchmesser auffielen. Weiterhin waren in diesen Riesenzellen häufig Vakuolen zu beobachten.

Elektronenmikroskopische Ergebnisse

Schon 4 Stunden nach Beendigung der VDC-Einwirkung war eine Vergrößerung des Kernes und seiner Oberfläche mit zusätzlichen Invaginationen zu sehen. Im Zeitraum zwischen 12 und 120 Stunden hatte sich die Pars amorpha der Nucleoli vergrößert und auch vermehrt; aus der ursprünglich zumeist nur in der Einzahl vorhandenen Pars amorpha pro Nucleolus waren bis zu sechs Partes amorphae in einem Kern entstanden. Weiterhin traten nach 10-12 Stunden starke Kernsegmentierungen, Chromatinklumpungen und Doppelmembransysteme im Kern auf.

Durch die Behandlung mit VDC kam es zwischen 12 und 120 Stunden zur Einlagerung von Fetttröpfchen in das Zytoplasma, das raue endoplasmatische Retikulum trat hervor, indem sich die Zisternen vergrößerten und vermehrten. Im gleichen Zeitintervall nahm auch die Anzahl der Mitochondrien zu. Mikrofilamente und Mikrotubuli hingegen blieben unverändert.

Abschließend ist zu erwähnen, daß einerseits die Veränderungen im Kern 4 Stunden nach der Behandlung mit VDC anfangen und nach 24-36 Stunden ihren Höhepunkt hatten, andererseits im Zytoplasma die morphologischen Wandlungen

später begannen (12 Stunden) und ihr Maximum erst nach 72-120 Stunden erreichten. 4 Stunden nach Gabe von TDC begann sich die Kernoberfläche zu vergrößern. Invaginationen, Kernsegmentierungen, Chromatinklumpungen und Doppelmembranstrukturen im Kern wurden ebenfalls sichtbar und wiesen Ähnlichkeiten mit den Befunden nach VDC-Gabe auf. Im Zeitraum 4-8 Stunden nach TDC-Applikation traten längliche, wurmförmige Verdichtungsfiguren im Nucleolus auf. Nach 8-10 Stunden war ein Teil dieser Figuren außerhalb des Kerns in nächster Nähe zur Kernmembran und zum jeweils darunterliegenden Nucleolus zu finden. Weiterhin fielen etwas später sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 50-80 nm im Zytoplasma auf, die aufgrund ihrer Form und Größe an intrazytoplasmatische Viren vom Typ A erinnern. Im Gegensatz zur VDC-Behandlung trat nach TDC-Applikation keine Veränderung in der Anzahl und Größe der Nucleoli auf. Intrazytoplasmatische Vakuolen, größere desintegrierte Zytoplasmabezirke, Schwellung der Zellorganellen, Verschwinden der Mikrovilli und Fetteinlagerungen waren typische Veränderungen nach 24-36 Stunden. Nach 36 Stunden begann die Phagozytose der geschädigten Tumorzellen, so daß nach 48-60 Stunden nur noch wenige Tumorzellen im Aszites zu finden waren. Nach 60-84 Stunden traten die schon anfänglich beschriebenen Riesenzellen auf.

2.1.4 Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus

Der Wirkungsmechanismus von VDC und TDC ist bisher nicht eindeutig geklärt. Da viele Untersuchungsergebnisse denen des DDP sehr ähnlich sind, liegt die Vermutung nahe, daß der Angriffspunkt von TDC und VDC wie beim DDP die DNA-Helix ist.

Es erscheint möglich (KÜPF-MAIER et al.²²), daß VDC und TDC - in ähnlicher Weise wie DDP - die DNA-Synthese durch bifunktionelle Verbrückungen innerhalb gleicher Stränge der DNA-Helices ("intrastrand cross-links") blockieren.

Die Verbrückung ist jedoch abhängig von dem Abstand ("bite") der beiden abdissoziierenden Cl-Atome des Metallocen-dichlorid-Moleküls. Dies erklärt auch die Unwirksamkeit der Metallocen-dichloride mit $M = \text{Hf}$ oder Zr , da der "bite" zwischen des Cl...Cl-Atomen um 3,1 nm bzw. 2,5 nm, also deutlich größer ist, als der vergleichbare "bite" von DDP. Demgegenüber differiert der "bite" von TDC nur um 1,2 nm, der von VDC um 0,5 nm von dem des DDP. Aus diesen Daten erscheint es wahrscheinlich, daß der "bite" von HDC und ZDC zu groß ist, um eine Querverbindung innerhalb der Helix herstellen zu können, so daß deshalb HDC und ZDC gegenüber dem Ehrlich-Aszites-Tumor unwirksam sein dürften. Die morphologischen Befunde bestätigen den postulierten primären Angriffspunkt der Substanzen an der DNA des Kerns. Es resultiert ein prämitotischer G_2 -Block, dessen Folgen im morphologischen Bild als Kernvergrößerungen, Doppelmembransysteme usw. zu erkennen sind.

Es ist darauf hinzuweisen, daß nach einmaliger VDC-Gabe eine Erholung der mitotischen Aktivität 12-24 Stunden nach Behandlung eintrat. Nach TDC-Gabe erfolgte kein Wiederaufleben der mitotischen Aktivität. Die Veränderung der Zellorganellen wurde als Ausdruck der Intensivierung der Proteinbiosynthese angesehen, während die DNA-Synthese blockiert war ("unbalanced cell growth") (KÜPF-MAIER²³).

2.2 Erkenntnisse über cis-Diammindichloroplatin(II) (DDP)

2.2.1 Kurzer historischer Überblick

Vor über 100 Jahren hat PEYRONE⁴⁴ in Liebigs Gießener Laboratorium das "Chlorid von Peyrone", eine Platindiammin-dichlorid-Verbindung synthetisiert. ROSENBERG et al.⁴⁹ entdeckte 1965 zufällig die zellteilungs- und wachstumshemmende Aktivität von DDP an Escherichia Coli.

In Fortführung dieser Arbeit zeigten 1969 ROSENBERG et al.^{50, 51}, daß DDP auch gegenüber den standardisierten Tumoren Sarcoma 180 und Leukämie L 1210 wirkt. Seit 1971 unterstützt das NATIONAL CANCER INSTITUTE die klinischen Tests mit DDP. Obwohl das DDP nach der Entdeckung seiner zytostatischen Wirksamkeit viel untersucht wurde, sind Fragen zum Wirkungsmechanismus und zur Veränderung der morphologischen Struktur der Zelle offen.

2.2.2 Erkenntnisse über die morphologischen Veränderungen

HEINEN und BASSELEER^{15, 16}, AGGARWAL^{2-5, 53} und SODHI^{2, 55-56} haben sich mit den morphologischen Veränderungen nach DDP-Behandlung auseinandergesetzt. AGGARWAL und SODHI untersuchten licht- und elektronenmikroskopisch die DDP-behandelten Zellen und die Beeinflussung der Zellkinetik von Säugetierzellen in vivo und in vitro. HEINEN und BASSELEER arbeiteten mit Hühnerfibroblasten, später an Ehrlich-Aszites-Tumoren, um zytochemische und zytologische Aspekte nach DDP-Behandlung zu betrachten.

AGGARWAL und SODHI^{55, 56} zeigten durch eindrucksvolle lichtmikroskopische Untersuchungen das Auftreten zweier verschiedener Arten von Riesenzellen nach DDP-Applikation. 4 Tage nach der Behandlung traten große, mehrkernige Zellen auf, deren Kerne durch dünne Karyoplasmabrücken untereinander verbunden und damit von der gleichen Kernmembran umhüllt waren. Als Ausdruck einer nicht vollendeten Zytokinese wurden die Einstülpungen der Zellmembranen in der Nähe der Kernbrücke interpretiert. Weiterhin wiesen die Autoren auf die Veränderungen an den Mikrofilamenten nach DDP-Behandlung hin: Während sich die Mikrofilamente bei der unbehandelten Zelle gleichmäßig im Zytoplasma verteilten, kam es eine halbe Stunde nach der DDP-Gabe zur ringförmigen Anordnung um den Kern und

etwa eine Stunde später waren die Mikrofilamente völlig verschwunden. Es wurde ein Zusammenhang zu der erwähnten unvollständigen Zellteilung angenommen.

10 Tage nach der DDP-Behandlung entstand die zweite Art von Riesenzellen, wobei DDP wahrscheinlich direkt auf die Zellmembran wirkte. Dadurch soll die Auflösung von Zellmembranabschnitten und das Zusammenfließen benachbarter Zellen erfolgen. Die aufgelösten Membranabschnitte blieben in den nun gebildeten Riesenzellen als Vesikel zurück.

Weiterhin wurde von AGGARWAL und SODHI eine eindeutige Hemmung der Mitoseaktivität aufgezeigt, die jedoch von der Behandlungslänge abhängt. Bei 24-stündiger Substanzexposition waren keine Mitosen mehr nachzuweisen, jedoch bei nur 1-stündiger Gabe von DDP war die Zahl der Mitosen immer noch halb so groß wie bei den unbehandelten Kontrollzellen. In weiterführenden in-vitro-Versuchen wurden behandelte Zellen wieder in frisches Nährmedium ohne Zytostatikumzusatz zurückgeführt; diese Zellen wiesen nach einer 24-stündigen Erholungsphase eine normale Mitoseaktivität auf. Außerdem wurde von AGGARWAL⁵ und SODHI⁵⁵ verdeutlicht, daß unmittelbar nach der Behandlung schon Veränderungen in den Zellen stattfanden. Anfänglich vergrößerte sich das Zytoplasma, später auch der Nucleus, wobei es dann zum Zusammenrücken der Zellorganellen um den Kern kam. Abgesehen von dieser ringförmigen Anordnung veränderten sich die Mitochondrien in ihrem Aussehen: Sie wurden transparenter und schwellen an, wobei die Cristae unregelmäßige Gestalt annahmen und die Lamina interna sich von der Außenmembran löste. Im Gegensatz zu diesen in-vitro-Befunden zeigten die Mitochondrien in vivo keine Veränderungen (SODHI⁵⁴). Andere Zellorganellen waren ebenfalls von der DDP-Behandlung betroffen. Der Golgiapparat löste sich bei vielen Zellen in Vesikel auf, die freien Ribosomen klumpten zusammen, und das rauhe

endoplasmatische Retikulum bildete sich zurück. Chromatinklumpungen waren ebenso wie transparente, wenig elektrodichte degenerierende Kerne zu beobachten. Demgegenüber wiesen die vorhandenen Riesenzellen weder Chromatinklumpungen noch Veränderungen am Golgiapparat auf.

Erwähnenswert ist die von SODHI⁵⁴ beschriebene Virusinduktion. Bei Sarcoma-180-Tumorzellen war das Freisetzen von membranumschlossenen, etwa 42 nm großen Viruspartikeln nach DDP-Applikation aufgefallen. Diese Viruspartikel waren stets in der Nähe von aufgelösten bzw. degenerierten Zellen zu sehen; sie wurden niemals im Kern oder Zytoplasma von intakten oder von Kontrollzellen beobachtet. SODHI hielt eine Veränderung der antigenen Struktur der Tumorzellen nach DDP-Gabe infolge der Virusfreisetzung für möglich. Diese Annahme der Veränderung der Antigenstruktur wurde u.a. auch durch das massive Einwandern immunkompetenter Zellen in den Tumor nach DDP-Behandlung bestätigt.

Auch KÜPF-MAIER³¹ untersuchte vergleichend zu TDC und VDC die morphologischen Veränderungen an Ehrlich-Aszites-Tumorzellen nach DDP-Behandlung. Die ersten Strukturwandlungen wurden 4 Stunden nach Applikation sichtbar. Dabei handelte es sich um Chromatinklumpungen, schrumpfende Zellen und deutliche Kernvergrößerungen. Nach 8-10 Stunden konnte man sphärische Partikel im Zytoplasma der Ehrlich-Aszites-Tumorzelle erkennen. Zwischen 24 und 36 Stunden traten dann Fetttröpfchen und desintegrierte Zytoplasmabezirke auf. Außerdem waren auch die Zellorganellen angeschwollen. Verzögert gegenüber TDC trat bei DDP-Behandlung die Phagozytose durch Makrophagen erst nach 48 Stunden ein. Zwischen 24 und 48 Stunden waren dann auch Riesenzellen sichtbar (KÜPF-MAIER³²).

ROSENBERG et al.⁵⁰ zeigten im Tierversuch, daß die mittlere Überlebensdauer nach DDP-Behandlung 1087 % betrug. Es soll auch darauf hingewiesen werden, daß experimentelle

Untersuchungen eines Synergismus der antineoplastischen Wirkung von DDP mit anderen Zytostatika (Bleomycin, Cytarabin, Cyclophosphamid ...) ergeben haben (BERGERAT, DREWINKO et al.¹⁰).

2.2.3 Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus

HEINEN und BASSELEER^{15, 16} postulieren eine Blockade der G₂-Phase und damit eine Verhinderung der DNA-Replikation. Aufgrund des G₂-Blockes soll es zu starken degenerativen Zellveränderungen kommen, so daß dem DDP offensichtlich ein zellschädigender Effekt zugesprochen werden kann. AGGARWAL und SODHI halten eine Hemmung der Zellteilung bei wiederholter Kernteilung für wahrscheinlich. Außer der Wirkung von DDP auf die DNA wird ein Einfluß auf die Mikrofilamente vermutet, der offensichtlich mit ihrer Zerstörung endet. Bei anderen Untersuchungen steht die Umstrukturierung der Zelloberfläche im Vordergrund, wodurch sich die antigene Struktur verändern soll. Zum einen wirkt DDP wahrscheinlich durch die Ablösung von Mucopolysacchariden direkt auf die Zelloberfläche, zum anderen kann die Veränderung der Antigenstruktur auf die Freisetzung von Viruspartikeln nach DDP-Behandlung zurückzuführen sein. ZWELLING und KOHN⁶¹ gehen davon aus, daß die beiden Chlorliganden intrazellulär gegen Wasser ausgetauscht werden und sich ein Aquo-Komplex bildet. Dieser Komplex kann entweder an eine DNA-Base binden oder bifunktionell zwei Basen eines DNA-Stranges ("intrastrand cross-linking") oder zwei Basen der jeweils komplementären DNA-Stränge ("interstrand cross-linking") miteinander vernetzen. DDP reagiert bevorzugt mit der Base Guanin (WELLHÖRNER⁵⁸).

2.2.4 Anwendung im klinischen Bereich

Pharmakologische Aspekte

Resorption: In der Klinik wird die Tagesdosis von DDP

im allgemeinen innerhalb einer 8-stündigen Infusionstherapie mit zusätzlicher Gabe von Kochsalzlösung, Glukose und Mannit zugeführt. Die Plasmaproteinbindung beträgt nach einer Stunde 50 %, sie ist jedoch später zunehmend. Das restliche freie DDP kann in die Tumorzelle inkorporiert werden und zytotoxisch wirken (MANAKA und WOLF⁴⁰).

Verteilung: Eine selektive DDP-Anreicherung im Tumorgewebe konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Die höchsten Gewebskonzentrationen wurden beim Menschen in der Leber, der Prostata und den Nieren gefunden (STEWART, BENJAMIN et al.⁵⁷).

Elimination: DDP wird biphasisch, hauptsächlich renal ausgeschieden. Die initiale Halbwertszeit beträgt weniger als 1 Stunde, die terminale 44-190 Stunden. Platin kann aber noch viele Monate nach Applikation im Körper nachgewiesen werden (RIBAUD, GOUVEIA et al.⁴⁷).

Nebenwirkungen bei DDP-Applikation

Nierenfunktionsstörungen sind die häufigsten Nebenwirkungen von DDP. Es treten Nekrosen in den Tubuli auf, die zum Teil irreversibel sind, die Ototoxizität basiert auf einem Verlust der Haarzellen im Cortischen Organ, der resultierende Hörverlust ist nicht reversibel. Die Einwirkung auf das Knochenmark führt zu einer Myelosuppression, die alle Zellreihen betreffen kann, jedoch im Vergleich zu anderen Zytostatika relativ wenig ausgeprägt ist. Veränderungen an Herz, Leber und Nervensystem sind beobachtet worden. DDP ist immunsuppressiv, Mutagenität ist von BECK et al.^{7, 8} und von MONTI-BRAGADIN⁴¹ nachgewiesen, eine eventuelle Kanzerogenität des DDPs für den Menschen wird diskutiert (IARC Working Group¹⁸).

Indikationen von DDP

DDP findet in der Klinik als Monotherapeutikum oder in Kombination mit anderen Zytostatika Anwendung gegenüber Hodentumoren, Prostata-, Blasen-, Ovarial-, Cervix-, Endometrium- und Bronchialtumoren ebenso wie gegenüber Plattenepithelkarzinomen des Hals-Kopf-Bereiches sowie Weichteil- und Knochensarkomen und malignen Melanomen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellen

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen wurden an einem seit vielen Jahren etablierten Tumorzellstamm menschlicher Herkunft, der KB-Tumorzelllinie, durchgeführt.

Hierbei handelte es sich ursprünglich um ein Epidermoidkarzinom eines 54-jährigen weißen Mannes (KB). Bei dem Patienten KB entwickelte sich fünf Wochen nach der Ex-
traktion von neun Zähnen im Oktober 1954 eine ulcerierende, bröcklige Neoplasie auf dem Mundboden und an der Zunge. Im Dezember 1954 wurde der Tumor entfernt und ein Teil des Biopsiematerials für die Gewebekultur zur Verfügung gestellt (EAGLE¹³). Seit dieser Zeit werden die KB-Zellen als Standardzelllinie in der Tumorforschung verwendet.

Die in den Versuchen verwendeten KB-Zellen wurden von der Firma GIBCO, Schottland, geliefert. Sie entstammten der 377. Passage, waren zunächst in flüssigem Sauerstoff eingefroren, wurden kurz vor dem Versand aufgetaut und als Monolayerkultur in Kulturflaschen mit etwa 50 cm² Kulturfläche angesetzt. Nach 12 bis 24-stündiger Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel, anschließend wurden die Zellen weiter bebrütet, bis der Zellrasen zugewachsen war. In diesem Zustand wurden die Zellen geliefert.

Die Firma GIBCO garantierte bei der Lieferung für die Sterilität und morphologische Identität der KB-Zellen. Zur Überprüfung wurden Zellen auf Standardnährböden übertragen und inkubiert. Auch eine Kontamination mit Mykoplasmen wurde mittels der Methode der DNA-Fluoreszenz (BARILE⁶) ausgeschlossen.

3.2 Züchtung der Zellkulturen

Die KB-Zellen wurden in heißluftsterilisierten Vierkantkulturflaschen nach Bred-Demeter als Monolayerkultur gehalten. Als Nährlösung diente Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen und 0,85 g/l NaHCO ohne Glutamin. Jeweils 1.000 ml dieser Lösung wurden kurz vor der Verwendung mit 125 ml fötalem Kälberserum, 13 ml L-Glutamin und 13 ml einer Antibiotikallösung (Antibiotikagehalt dieser Lösung: 10 mg Streptomycin pro ml und 1.000 I.E. Penizillin pro ml) ergänzt. Das Medium, das Serum und die anderen Zusatzstoffe wurden von der Firma SEROMED, München, bezogen.

Unmittelbar nach Lieferung der KB-Zellen wurde die Nährlösung in den angelieferten Kulturflaschen um 2/3 reduziert. Die Kulturflaschen wurden zunächst für 24 Stunden im trockenen Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde auch das übrige Medium abgegossen, und die Monolayer-Zellschicht mit einer Trypsinlösung (0,25 % Trypsin in PBS ohne Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, bezogen von der Firma SEROMED, München) vollständig überdeckt und gewaschen. Nach Abgießen dieser Flüssigkeit wurden erneut 5 ml der Trypsinlösung in die Kulturflasche eingefüllt und bei 37°C inkubiert.

Während dieser Zeit lösten sich die Zellen vom Glasboden der Flasche ab. Das Trypsin wurde dann mit 15 ml vorgewärmtem, 12,5 % Serum enthaltendem MEM inaktiviert. Nach Suspendierung der Zellen wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 900 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Oberstand wurde abgegossen, die Zellen wurden mit ergänztem MEM (s. oben) resuspendiert und die Zellzahl pro Volumen in der Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden anschließend so auf frische, mit 15 ml ergänztem Medium angefüllte Kulturflaschen verteilt, daß in jede der vorbereiteten Flaschen $1,5 \times 10^6$ Zellen eingesät wurden. Die

Zellen wurden als Permanentkultur gehalten und bei 37°C im trockenen Brutschrank inkubiert.

Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Subkultivierungszeitpunkten betrug jeweils 5 Tage. Die Subkultivierung erfolgte immer nach dem oben beschriebenen Ablauf. Für die Zwecke der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen bis zur 18. Passage nach Lieferung gezüchtet. Zum Ansetzen der Testreihen wurden bei der Subkultivierung Zellen aus der permanent gehaltenen Mutterkultur entnommen, ohne dabei die Dauerkultur in ihren Kultivierungsbedingungen zu beeinflussen.

Während der gesamten Züchtungsdauer der KB-Zellen wurde - zusätzlich zur Subkultivierung - alle 2 bis 3 Tage die Nährlösung gewechselt. Die für die Kultivierung verwendeten Flüssigkeiten wurden immer vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Das Arbeiten mit der Kultur erfolgte unter einer Sterilhaube. Die für die Kultivierung benötigten Glasgefäße und Gummistopfen wurden heißluftsterilisiert.

3.3 Substanzen und Substanzexposition

Im Rahmen der hier geschilderten Untersuchungen wurde die in-vitro-Wirksamkeit der in vivo tumorhemmend aktiven metallorganischen Verbindungen Titanocen-dichlorid (TDC) und Vanadocen-dichlorid (VDC) sowie des bereits in der Klinik als Zytostatikum eingesetzten cis-Diammindichloroplatin(II) (PLATINEX^R, CISMPLAT^R) analysiert.

Die Substanzen wurden im Arbeitskreis von H. KÖPF am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Technischen Universität Berlin synthetisiert. Der Reinheitsgrad der Substanzen konnte elementaranalytisch (C, H, Cl; Abweichungen unter $\pm 0,5 \%$ der berechneten Werte) sowie IR- und ¹H-NMR spektroskopisch sichergestellt werden.

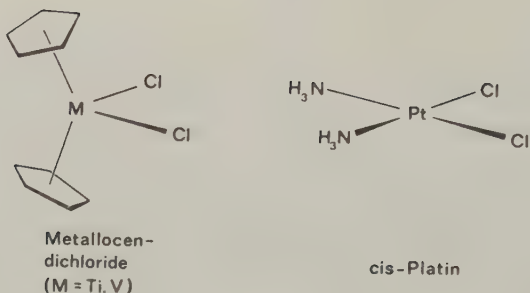


Abb. 1: Strukturformel von TDC, VDC und DDP (cis-Platin)

Bei den Metallocen-dichloriden handelt es sich um Komplexverbindungen, bei denen ein zentrales Metallatom (Titan oder Vanadium) von vier Liganden, und zwar von zwei Chlor- und zwei Cyclopentadienyl-Liganden, umgeben ist. DDP besitzt dagegen ein zentrales Platinatom, an das zwei Chlor- und zwei Ammoniakliganden gebunden sind (Abb.1).

In allen Fällen wurden die Substanzen vor der Zugabe zu den Kulturflaschen in Dimethylsulfoxid (DMSO, bezogen von der Firma SERVA, Heidelberg) unter 3-minütiger Ultraschallbehandlung gelöst bzw. suspendiert. Die jeweiligen Substanzkonzentrationen sind der Tabelle I zu entnehmen.

Da die bei den Testreihen verwendeten Konzentrationen teilweise nicht mehr abwägbar waren, mußten sie durch Anwendung der Verdünnungsmethode hergestellt werden. Sie soll am Beispiel des VDC erläutert werden:

Zuerst wurden 100 ml einer 10^{-4} -molaren Lösung hergestellt, indem 2,5 mg VDC abgewogen, in 0,5 ml DMSO gelöst und mit ergänztem MEM auf 100 ml aufgefüllt wurden. Durch Verdün-

Substanz	Konzentrationsstufe		
	niedrigste	mittlere	höchste
DDP	5×10^{-7} M	5×10^{-6} M	5×10^{-5} M
TDC	5×10^{-5} M	5×10^{-4} M	5×10^{-3} M
VDC	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M

Tabelle I: Substanzkonzentrationen von DDP, TDC und VDC

nung dieser 10^{-4} -molaren Lösung mit ergänztem MEM im Verhältnis 1:9 wurde eine 10^{-5} -molare Lösung erreicht. Wurde darüber hinaus eine 10^{-6} -molare Lösung benötigt, erfolgte wieder ein Verdünnen der 10^{-5} -molaren Lösung im Verhältnis 1:9.

Die verschiedenen Konzentrationen von DDP wurden ebenfalls nach der Verdünnungsmethode hergestellt. Das TDC brauchte im Gegensatz zum VDC und DDP nicht verdünnt zu werden, da es in allen verwendeten Konzentrationen abwägbar war.

Anschließend wurden die unterschiedlich konzentrierten Substanzlösungen so mit DMSO ergänzt, daß bei der Zugabe der Substanzen zu den Kulturflaschen eine jeweils 0,5%ige DMSO-Lösung vorlag. Der Nährlösung der Kontrollflaschen wurde ebenfalls 0,5%ige DMSO, jedoch kein Zytostatikum, d.h. weder TDC noch VDC noch DDP, zugesetzt.

Um die Wirkung der Substanzen auf KB-Zellen zu testen, wurde der Zellrasen mit der angesetzten substanzhaltigen Nährlösung 90 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgegossen und der Zellrasen mit MEM zweimal gründlich gespült, um die Substanzen vollständig zu entfernen. Die Kulturflaschen wurden dann mit je 15 ml frischem ergänztem MEM aufgefüllt und erneut bei 37°C bebrütet. Nach unterschiedlichen, in Tabelle II aufgeführten Intervallen wurden die Kulturen wieder dem Brutschrank entnommen und die Untersuchungen durchgeführt.

3.4 Wachstumsverhalten - Avitalitätsindex

Die Art des Versuchsansatzes zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens und des Avitalitätsindex ist Tabelle II zu entnehmen. Die Zelleinsaat betrug standardisiert $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Kulturflasche. Erst 24 Stunden nach Zelleinsaat erfolgte die Substanzexposition in der in Kapitel 3.3 beschriebenen Weise. Dieses Intervall mußte eingehalten werden, um ein gutes Anwachsen der Zellen auf dem Kulturflaschenboden sicherzustellen.

Für jeden Dosisschritt der drei Substanzen und für jeden Zeitwert wurden je 4 Versuchsflaschen angesetzt. Außerdem wurden jeweils 4 Kontrollflaschen (vgl. Kapitel 3.3) pro Zeitwert mitgeführt.

Zu jedem Zeitpunkt wurden die entsprechenden Versuchsflaschen dem Brutschrank entnommen und die Zellen nach dem Abgießen des MEM unter Einsatz von Trypsin vom Flaschenboden abgelöst. Der zellhaltigen Trypsinlösung wurden dann 15 ml serumhaltiges MEM zugefügt und bei 900 min^{-1} zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurden die abgesetzten Zellen in 2 ml MEM kräftig suspendiert.

Zur Bestimmung des Avitalitätsindex wurden auf einen Objektträger ein Tropfen dieser Zellsuspension und ein Tropfen einer Lissamingrünlösung verrührt. Nach 5 Minuten konnten ungefärbte und gefärbte Zellen differenziert werden. Bei den ungefärbten Zellen handelte es sich um vitale, nicht in ihrem Stoffwechsel beeinflusste Zellen. Gefärbte Zellen hingegen waren entweder avital oder defekt, wobei jedoch die defekten Zellen irreversibel in ihrem Stoffwechsel gestört waren und als Zustand vor dem Zelltod zu verstehen sind (HOLMBERG¹⁷).

Wird im folgenden der Begriff "avital" verwendet, so schließt er diese defekten, stark stoffwechselgeschädigten Zellen ein. Bei jeder Probe wurden insgesamt 1.000 Zellen ausgezählt. Das Lissamingrün wurde von der Firma CHROMA, Stuttgart, bezogen und als 1%ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung angewandt.

Die übrige Zellsuspension wurde mit 10%igem Formalin (gepuffert mit Na-Cacodylat, pH 7,2) fixiert. Die Zellzahl in dieser Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Zählkammer ermittelt und auf 1 ml ursprünglichen Flascheninhalts umgerechnet.

Diese Methode zur Bestimmung der Zellzahl nach Trypsinierung, Suspendierung und Fixierung wurde gewählt, da ein direktes Auszählen der Monolayerzellschicht aufgrund des ungleichmäßigen Wachstums auf dem Kulturflaschenboden stark fehlerbehaftet gewesen wäre. Außerdem konnte mit Hilfe der benutzten Methode die Zellzahlbestimmung zu einem beliebigen Zeitpunkt durchgeführt werden.

3.5 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Der Versuchsansatz für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde nicht in den Kulturflaschen, sondern in LAB-TEK-Zellkultur-Objektträgern (NEUMANN, BECHMANN⁴³),

Hersteller ist Firma MILES Laboratories, USA, durchgeführt.

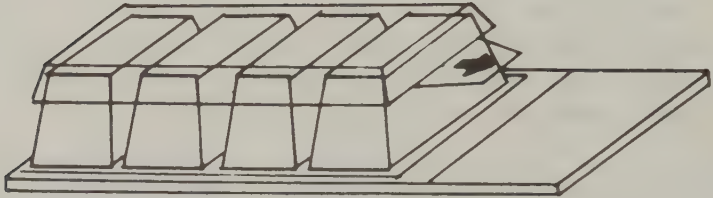


Abb. 2: LAB-TEK^R Zellkultur-Objektträger

In Abb.2 ist ein solcher Zellkulturobjektträger mit 4 Kammern dargestellt. Bei dem Kammeraufsatz handelt es sich um einen durchsichtigen, nicht toxischen Kunststoffrahmen, der mit einem Deckel aus gleichem Material geschlossen und mittels einer Silicondichtungsmasse auf einem Glasobjektträger befestigt ist. Vorteil der LAB-TEK-Objektträger ist die Möglichkeit der direkten Fixierung und Färbung der Zellen entweder gesondert in den einzelnen Kammern oder - nach Abnahme des Kammeraufsatzes - im Bereich des ganzen Objektträgers. Außer der Verwendung eines anderen Kulturgefäßes waren die Versuchsbedingungen für die lichtmikroskopische Untersuchung identisch mit denen zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens und des Avitalitätsindex. Sie sind Tabelle II zu entnehmen.

Zunächst erfolgte in jede der Kammern, die vorher mit 1 ml ergänztem MEM gefüllt wurde, eine Zelleinsaat von $1,5 \times 10^5$ Zellen. Nach Inkubation und Substanzexposition (vgl. Kapitel 3.3) wurde dann zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten das Medium aus den Kammern abgesehen,

der Zellrasen mit -18°C kaltem Aceton überschichtet und 15 Minuten lang fixiert. Nach Entfernung des Kammeraufsatzes erfolgte die Trocknung der Objektträger mit dem Zellrasen an der Luft. Gefärbt wurden die Zellen 15 Minuten lang mit Mayers Hämalaun-Lösung, die Entwässerung geschah in der aufsteigenden Alkoholreihe.

Zur Betrachtung stand ein Fotomikroskop zur Verfügung, an dem auch die Fotografien bei 400- bis 600-facher Vergrößerung angefertigt wurden.

3.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen benötigten Zellen wurden - wie in Kapitel 3.2 beschrieben - in Vierkantkulturflaschen mit einer Zellsaat von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Flasche angesetzt.

Die experimentellen Daten sind der Tabelle II zu entnehmen. Im Vergleich zu den vorangegangenen Testreihen wurden die Versuchsbedingungen etwas modifiziert:

a) Auf die höchstkonzentrierte Substanzgabe wurde verzichtet, da hierbei die Zellen in kurzer Zeit strukturell vollständig zerstört waren und die elektronenmikroskopische Betrachtung daher keine differenzierte Aussage zuließ.

b) In den Zeitraum der ersten 24 Stunden wurden mehrere Untersuchungszeitpunkte gelegt, da in dieser Zeit auf ultrastruktureller Ebene bereits morphologische Veränderungen zu erwarten waren.

Zu den jeweiligen in Tabelle II aufgeführten Zeitwerten wurden die Kulturflaschen dem Brutschrank entnommen und eine Stunde mit dem Fixationsgemisch nach KARNOVSKI fixiert (100 ml der Karnovski-Lösung enthalten: 30 ml Glutaraldehyd 10%ig, 30 ml Cacodylatpuffer 0,2 M, 40 ml Paraformaldehyd 7,5%ig und 50 mg CaCl_2 , bei einem

pH von 7,2 und mit Cacodylatpuffer gespült. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Silikon-schabers von ihrer Unterlage abgelöst und in einer Osmium-tetroxidlösung (1 % OsO_4 in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer) für eine Stunde nachfixiert.

Daraufhin wurden die Zellen in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in das Kunstharz MIKROPAL^R (FERAK, Berlin) eingebettet.

Die Ultradünnschnitte, angefertigt mit dem REICHERT-Ultramikrotom, wurden zunächst mit wäßriger 1%iger Uranylacetat-Lösung sowie mit Bleizitrat nach REYNOLDS⁴⁶ nachkontrastiert und dann im SIEMENS-Elmiskop Ia bei 2.500- bis 30.000-facher Vergrößerung betrachtet und fotografiert.

4. BEFUNDE

4.1 Wachstumsverhalten

Es wurde das Wachstumsverhalten der KB-Zellen nach einer 90-minütigen Exposition mit TDC, VDC sowie DDP gemessen und als Funktion der Expositionszeit dargestellt.

4.1.1 Grundlagen -----

Zunächst sollen die in der nachfolgenden Beschreibung des Wachstumsverhaltens verwendeten Begriffe definiert und erläutert werden.

a) Wachstumsrate

$$W(t) = \frac{Z(t)}{Z(0)}$$

$W(t)$ = Wachstumsrate zur Zeit t

$Z(t)$ = Zellzahl pro ml zur Zeit t

$Z(0)$ = Zellzahl pro ml am Ende der Substanzexposition

Die Wachstumsrate zur Zeit t gibt an, um das Wievielfache sich die Zellen seit Beginn der Untersuchung bis zum Zeitpunkt t vermehrt haben. $W(t)$ beschreibt also das Wachstum einer gegebenen Zellpopulation.

b) relative Zellzahl

$$RZ(t) = \frac{Z_{\text{exp}}(t)}{Z_{\text{kon}}(t)} \times 100 \quad \text{in \%}$$

$RZ(t)$ = relative Zellzahl zur Zeit t

$Z_{\text{exp}}(t)$ = Zellzahl der exponierten Zellen zur Zeit t

$Z_{\text{kon}}(t)$ = Zellzahl der Kontrollzellen zur Zeit t

Die relative Zellzahl ist das Verhältnis zwischen den Zellzahlen der exponierten und der Kontrollzellen zur Zeit t.

c) relatives Wachstum

Das relative Wachstum gibt im Gegensatz zur relativen Zellzahl RZ nicht das Verhältnis der Zellzahlen, sondern das Verhältnis der Wachstumsraten zueinander an.

$$RW(t) = \frac{W_{exp}(t)}{W_{Kon}(t)} = \frac{\frac{Z_{exp}(t)}{Z_{exp}(0)}}{\frac{Z_{Kon}(t)}{Z_{Kon}(0)}} = \frac{Z_{exp}(t)}{Z_{Kon}(t)} = RZ(t)$$

$RW(t)$ = relatives Wachstum zur Zeit t

$W_{exp}(t)$ = Wachstumsrate der exponierten Zellen zur Zeit t

$W_{Kon}(t)$ = Wachstumsrate der Kontrollzellen zur Zeit t

Da die Anzahl der Zellen bei der Einsaat stets die gleiche war und somit $Z_{Kon}(0)$ und $Z_{exp}(0)$ identisch sind, gilt $RW(t) = RZ(t)$. Deshalb können für die hier beschriebenen Experimente die relative Zellzahl RZ und das relative Wachstum RW synonym verwendet werden.

d) Zytostatischer Effekt

$$E(t) = \frac{Z_{Kon}(t) - Z_{exp}(t)}{Z_{Kon}(t)} \times 100 \text{ in } \%$$

$E(t)$ = zytostatischer Effekt

Unter zytostatischem Effekt soll die auf die Kontrollzellzahl bezogene Differenz der Zellzahlen von Kontrollzellen und exponierten Zellen verstanden werden. Unter Berücksichtigung von $RW = \frac{Z_{\text{exp}}}{Z_{\text{Kon}}}$ läßt sich der zytostatische Effekt auch durch $E = 100 - RW$ ausdrücken. Wachsen die exponierten Zellen und die Kontrollzellen gleichermaßen ($Z_{\text{exp}}(t) = Z_{\text{Kon}}(t)$), so ist kein wachstumshemmender Effekt vorhanden. Entsprechend ist dann $E(t) = 0 \%$. Sind alle exponierten Zellen avital ($Z_{\text{exp}}(t) = 0$), wird $E(t) = 100 \%$. Beträgt etwa die Zellzahl der exponierten Zellen nur 75 % der Kontrollzellzahl, so liegt ein zytostatischer Effekt von $E(t) = 25 \%$ vor.

4.1.2 Wachstumsverhalten der Kontrollzellen

Bei den Kontrollen handelt es sich um unbehandelte KB-Zellen, die zum Wachstumsvergleich unter ständig gleichen Bedingungen mit den Versuchsreihen mitgeführt wurden. Die Zellzahl wurde sofort nach Beendigung der Exposition der Substanzen sowie nach 12, 24, 48 und 72 Stunden ermittelt.

Die durchgeführten Testreihen bei verschiedenen Konzentrationen sind der Tabelle II zu entnehmen. Das Wachstumsverhalten von unbehandelten KB-Zellen sowie von KB-Zellen nach einer 90-minütigen Behandlung mit VDC, TDC und DDP in unterschiedlichen Konzentrationen ist in den Abb. 3a, 4a und 5a dargestellt. Aufgetragen sind die Zellzahlen von exponierten Zellen und Kontrollpopulationen in logarithmischem Maßstab in Abhängigkeit von der linear aufgetragenen Expositionszeit t .

Bei den unbehandelten Kontrollzellen liegt in den ersten 12 Stunden ein sehr flacher Wachstumsanstieg vor. Im nächsten 12h-Zeitintervall ist ein starker Anstieg zu erkennen, die Zellzahl der Kontrollpopulation bei der

DDP- bzw. TDC-Meßreihe verdoppelt sich. Die Wachstumsrate der Kontrollzellen des VDC-Tests beträgt das 1,5-fache nach 24 Stunden.

Das Wachstum verläuft auch in den folgenden 24 Stunden exponentiell, jedoch werden etwas unterschiedliche 48h-Werte für die Zellzahlen gemessen. Sie betragen etwa $4,5 \times 10^5$ Zellen pro ml. Nach 72 Stunden war die Zellzahl der unbehandelten KB-Zellen bei allen drei Testreihen von anfänglich $1,5 \times 10^5$ auf Werte um 17×10^5 Zellen pro ml angestiegen, d.h. die Zellzahl hat das 11-fache des Anfangswertes erreicht.

Da bei der Beschreibung der Befunde nach Substanzexposition immer auf die jeweils zugeordneten Kontrollpopulationen Bezug genommen wird, muß bei der Beurteilung des Wachstumsverhaltens auch den Unterschieden zwischen den Kontrollzahlen der einzelnen Testreihen Rechnung getragen werden.

4.1.3 Wachstumsverhalten nach Gabe von DDP

Das Wachstumsverhalten nach DDP-Exposition wird in Abb.3a gezeigt. Nach der Gabe von einer 5×10^{-5} -molaren DDP-Lösung ist eine kontinuierliche Zellabnahme vorhanden, so daß sich nach 72 Stunden fast keine Zellen mehr nachweisen lassen (RZ = 1 %).

Bei der mittleren Konzentration (5×10^{-6} -molare DDP-Lösung) ist der Anstieg relativ gleichmäßig für alle Zeitpunkte, jedoch deutlich geringer als bei der Kontrollpopulation. Nach 72 Stunden beträgt die relative Zellzahl 24 %.

Wachstumsverhalten
von
KB-Zellen
nach
 $\text{cis}-(\text{NH}_3)_2 \text{PtCl}_2$ -Behandlung

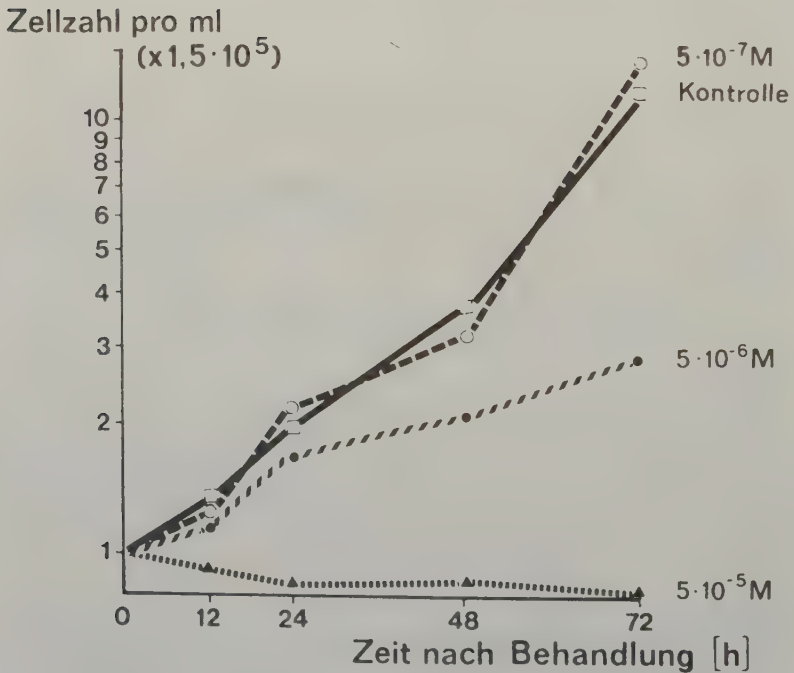


Abb. 3a:

Darstellung der Wirkung von verschiedenen DDP-Konzentrationen auf das Wachstumsverhalten von KB-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit t nach Beendigung der Substanzexposition.

Zytostatischer Effekt
von
KB-Zellen
nach
cis-(NH₃)₂ Pt Cl₂-Behandlung

Zytostatischer Effekt [%]

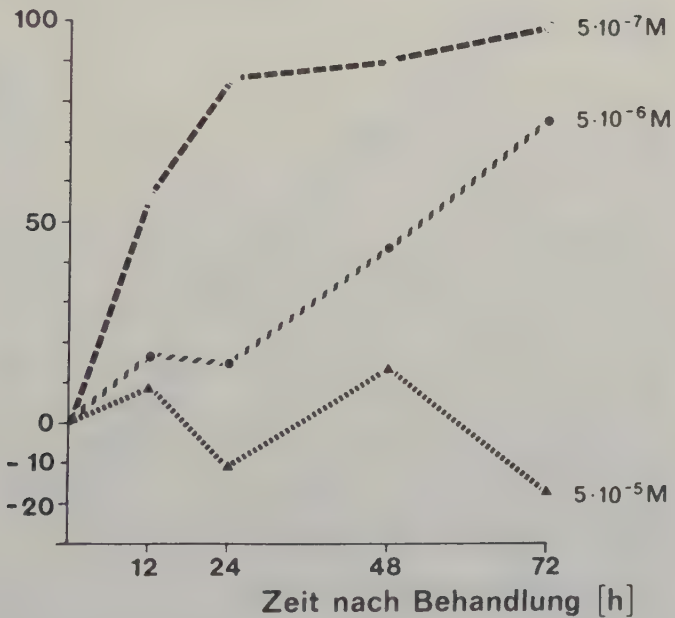


Abb. 3b:

Darstellung des zytostatischen Effektes von DDP in Abhängigkeit von der Zeit t nach Beendigung der Substanzexposition und der Konzentration.

Die Exposition mit der niedrigsten Konzentration, einer 5×10^{-7} -molaren Lösung, ergibt ein auffälliges Bild im Vergleich zur Kontrolle. Die Verdopplung erfolgt in den ersten 24 Stunden, worauf ein sehr flacher Anstieg folgt, der dann wieder nach 48 Stunden von einem steilen Anstieg abgelöst wird. Es ist somit festzustellen, daß sich die Zellen bei der niedrigsten DDP-Konzentration stärker vermehren als die unbehandelten Kontrollzellen, wobei eine relative Zellzahl von 117 % erreicht wird. Abb.3b zeigt den zytostatischen Effekt für alle drei DDP-Konzentrationen. Nach 72 Stunden beträgt er für die 10^{-6} -molare Lösung 76 %, für die 10^{-7} -molare Lösung -17 %.

4.1.4 Wachstumsverhalten nach Gabe von TDC

Die Wachstumsreihe der KB-Zellen nach TDC-Behandlung ist in der Abb.4a dargestellt. Bei der höchsten der gewählten Konzentrationen (5×10^{-3} M) nimmt die Zellzahl in den ersten 24 Stunden rapide ab. In den weiteren Zeitintervallen lassen sich keine intakten Zellen mehr nachweisen. Es wurde daher bei den weiteren Untersuchungen mit niedrigeren Konzentrationen gearbeitet.

Bei der 5×10^{-4} -molaren Lösung stagnierte in den ersten 12 Stunden das Zellwachstum. Innerhalb der nächsten 12 Stunden ist der gleiche Wachstumsanstieg wie bei den Kontrollzellen festzustellen. Darauf folgt ein relativ flaches Ansteigen bis zu einem Wert von 27 % für die relative Zellzahl bei 72 Stunden.

Die Exposition mit einer 5×10^{-5} -molaren Lösung ergibt für die Zellen ein zur Kontrollpopulation streng paralleles Wachstum, wobei die Zellzahlen der Kontrollen immer etwas niedriger liegen. Der 72h-Wert für die relative Zellzahl beträgt 112 %. Der zytostatische Effekt für die Exposition mit TDC ist in Abb.4b gezeigt. Nach 72 Stunden

Wachstumsverhalten
von
KB-Zellen
nach
(C_5H_5)₂TiCl₂-Behandlung

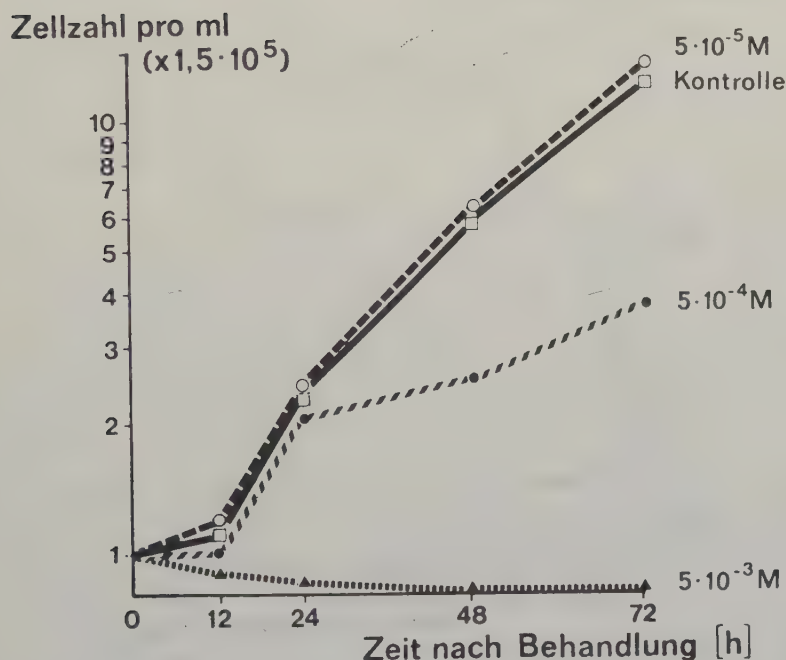


Abb. 4a:

Darstellung der Wirkung von verschiedenen TDC-Konzentrationen auf das Wachstumsverhalten von KB-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit t nach Beendigung der Substanzexposition.

Zytostatischer Effekt
von
KB-Zellen
nach
 $(C_5H_5)_2 Ti Cl_2$ - Behandlung

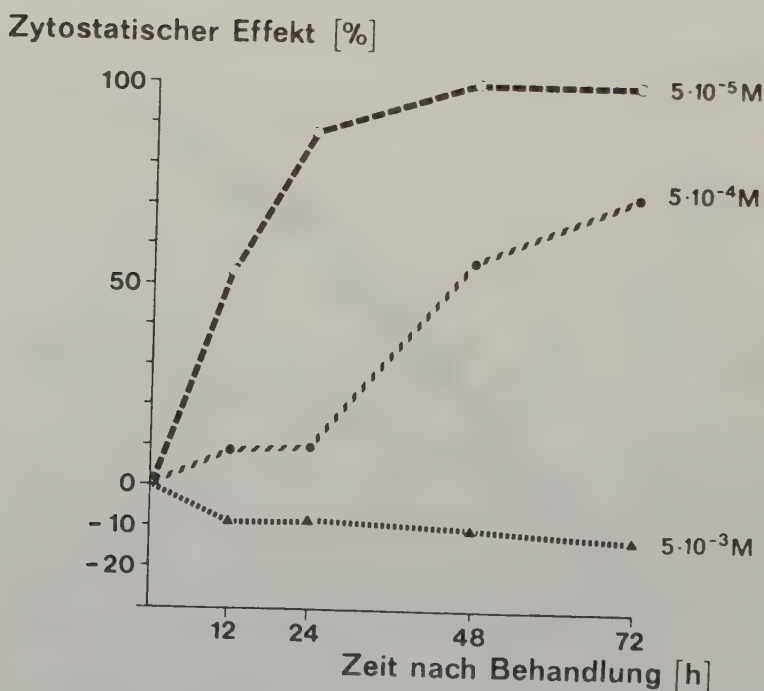


Abb. 4b:

Darstellung des zytostatischen Effektes von TDC in Abhängigkeit von der Zeit t nach Beendigung der Substanzexposition und der Konzentration.

beträgt er bei der 5×10^{-4} -molaren Lösung 73 %, bei der 5×10^{-5} -molaren Lösung -12 %.

4.1.5 Wachstumsverhalten nach Gabe von VDC

Das Wachstumsverhalten nach VDC-Gabe wird in der Abb.5a gezeigt. Bei der höchsten VDC-Konzentration (10^{-4} M) verringert sich die Anzahl der Zellen in den ersten 12 Stunden so stark, daß sich danach keine intakten Zellen mehr nachweisen lassen.

Bei der 10^{-5} -molaren Lösung erreicht die relative Zellzahl nach anfänglichem Absinken einen 24h-Wert von 84 %. Sie verringert sich danach, bis sie nach 72 Stunden nur noch 28 % beträgt.

Die einer 10^{-6} -molaren VDC-Lösung ausgesetzten Zellen zeigen in den ersten 12 Stunden kein Wachstum, während nach 24 Stunden das relative Wachstum immerhin 74 % beträgt. Im nächsten Zeitintervall erfolgt eine Annäherung der Zellzahl an den Kontrollwert, nach 72 Stunden ist sie jedoch wieder geringer als er, die relative Zellzahl beträgt zu diesem Zeitpunkt 71 %.

Im Gegensatz zum Wachstumsverhalten nach Gabe der niedrigsten Konzentrationen von DDP und TDC überschreitet bei der geringsten VDC-Konzentration die Zellzahl den Kontrollwert nicht.

Der zytostatische Effekt für VDC-Exposition ist in der Abb.5b gezeigt. Die 72h-Werte betragen 72 % für die 10^{-5} -molare Lösung und 29 % für die 10^{-6} -molare Lösung.

Wachstumsverhalten
von
KB-Zellen
nach
(C_5H_5) $_2VCl_2$ -Behandlung

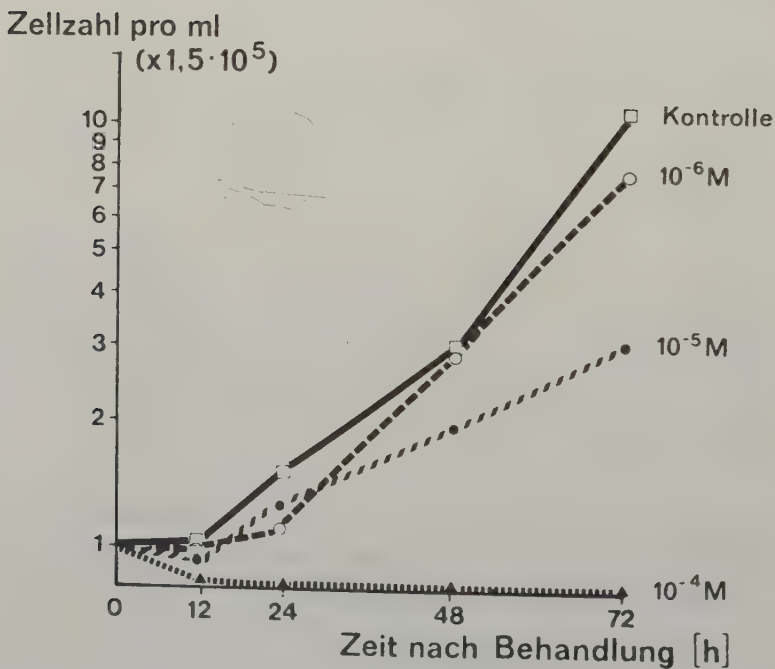


Abb. 5a:

Darstellung der Wirkung von verschiedenen VDC-Konzentrationen auf das Wachstumsverhalten von KB-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit t nach Beendigung der Substanzexposition.

**Zytostatischer Effekt
von
KB-Zellen
nach
(C₅H₅)₂ VCl₂ - Behandlung**

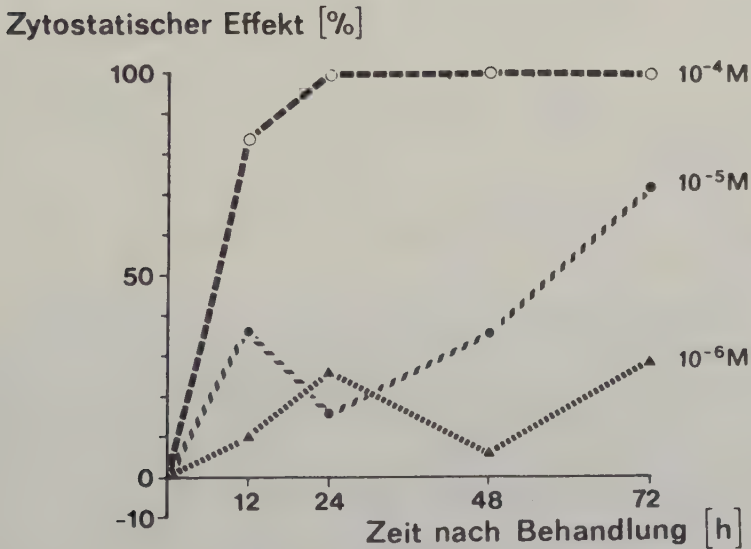


Abb. 5b:

Darstellung des zytostatischen Effektes von VDC in Abhängigkeit von der Zeit t nach Beendigung der Substanzexposition und der Konzentration.

4.2 Avitalitätsindex

4.2.1 Avitalitätsindex - Sterberate

Der Avitalitätsindex für die Substanzen VDC, TDC und DDP sowie für die Kontrollen ist in den folgenden Abbildungen dargestellt. Er gibt den prozentualen Anteil von avitalen Zellen an der Gesamtzellzahl an und ist somit Ausdruck der Sterberate (siehe Kapitel 3.4).

4.2.2 Avitalitätsindex der Kontrollzellen

Bei den Kontrollzellen sind kaum avitale Zellen vorhanden. Der höchste Anteil avitaler Zellen ist nach 72 Stunden zu verzeichnen; er beträgt dann durchschnittlich 5 %.

4.2.3 Avitalitätsindex nach Gabe von DDP

Unmittelbar nach 90-minütiger Exposition mit der höchst-konzentrierten DDP-Lösung (5×10^{-5} -molare Lösung) sind die KB-Zellen zu 90 % avital. Innerhalb der ersten 24 Stunden nimmt die Anzahl der lebenden Zellen weiterhin ab (12h-Wert = 97 % avitale Zellen), bis schließlich nach 24 Stunden keine lebenden Zellen mehr vorhanden sind.

Zwischen der hohen Sterberate bei der 5×10^{-5} -Lösung und der sehr geringen Sterberate der Kontrollzellen liegen unterhalb der 50%-Grenze die Avitalitätsindices der mittleren (5×10^{-6} M) und der am niedrigsten konzentrierten (5×10^{-7} M) Substanzlösung. Bei der mittleren Konzentration liegt der Wert gleich nach der Beendigung der Exposition bei 39 %, bei der niedrigsten Konzentration beträgt er 27 %. Bei der 5×10^{-6} -molaren Lösung beträgt die Sterberate beim 72h-Wert 45 %, bei der 5×10^{-7} -molaren Lösung beträgt sie 31 %. Das Ansteigen der avitalen Zellen zwi-

**Avitalitätsindex
von
KB-Zellen
nach
 $\text{cis}-(\text{NH}_3)_2 \text{PtCl}_2$ -Behandlung**

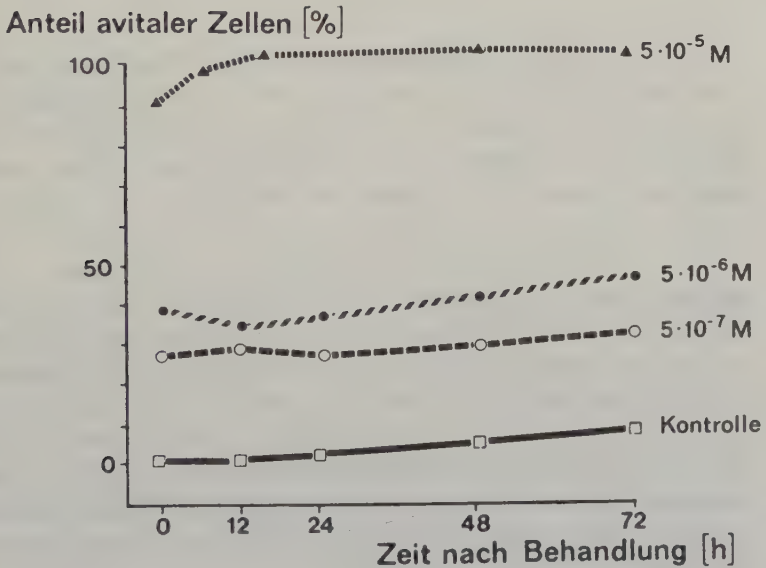


Abb. 6:

Darstellung der Avitalitätsindices von KB-Zellen nach DDP-Exposition in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit t nach Beendigung der Substanzexposition.

schen der Anfangszeit (0h) und dem Untersuchungsendpunkt (72h) beträgt bei diesen beiden Konzentrationen zwischen 4 % und 6 % und liegt damit im gleichen Bereich wie die Zunahme der avitalen Zellen bei den Kontrollzellen.

4.2.4 Avitalitätsindex nach Gabe von TDC

Nach Applikation der 5×10^{-3} -molaren TDC-Lösung sind nach Beendigung der Substanzexposition nur noch 10 % der KB-Zellen vital. Auch diese sterben in den ersten 12 Stunden, so daß danach beim 72h-Wert der Avitalitätsindex 100 % beträgt.

Für die mittlere Konzentration des TDC (5×10^{-4} M) zeigt sich unmittelbar nach Exposition ein Avitalitätsindex von 29 %. Die Sterberate steigt dann bis auf 37 % nach 72 Stunden an. Der Anstieg des Avitalitätsindex liegt etwas über dem durchschnittlichen Anstieg bei den Kontrollzellen.

Bei der niedrigsten Konzentration sind nach Beendigung der Exposition 25 % der Zellen tot. Innerhalb der nächsten 3 Tage steigt der Avitalitätsindex und wird dabei größer als die Sterberate bei der mittleren TDC-Konzentration. Nach 72 Stunden sind 41 % der Zellen avital. Der Anstieg des Avitalitätsindex bei der niedrigsten Konzentration zwischen 0 und 72 Stunden ist mit 16 % doppelt so groß wie der Anstieg um 8 % bei der mittleren Konzentration des TDC.

Anschließend seien in den Abb.8-11 beispielhaft einige lichtmikroskopische Aufnahmen wiedergegeben, welche die Zellpräparate der Lissamingrün-Färbung (Vital-Färbung) für alle angewandten Konzentrationen von TDC unmittelbar nach Expositionsende zeigen. Die vitalen, nicht gefärbten Zellen erscheinen hell, die avitalen farbstoffhaltigen sind dunkel.

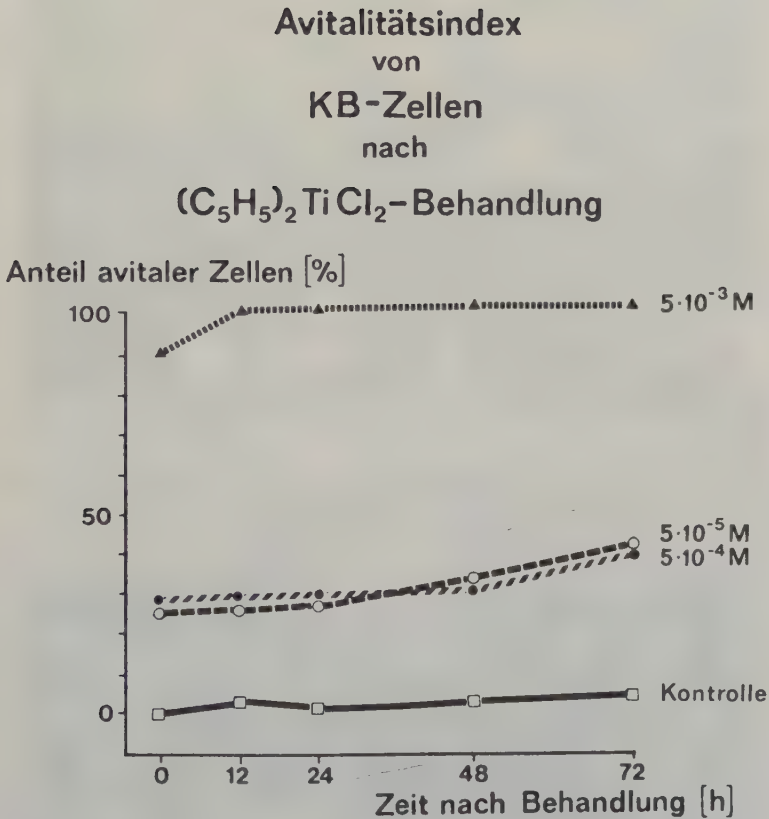


Abb. 7:

Darstellung der Avitalitätsindizes von KB-Zellen nach TDC-Exposition in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit t nach Beendigung der Substanzexposition.

Abb. 8 - 11: Vitalitätsfärbungen von KB-Zellen unmittelbar nach Behandlungsende ($t=0h$)

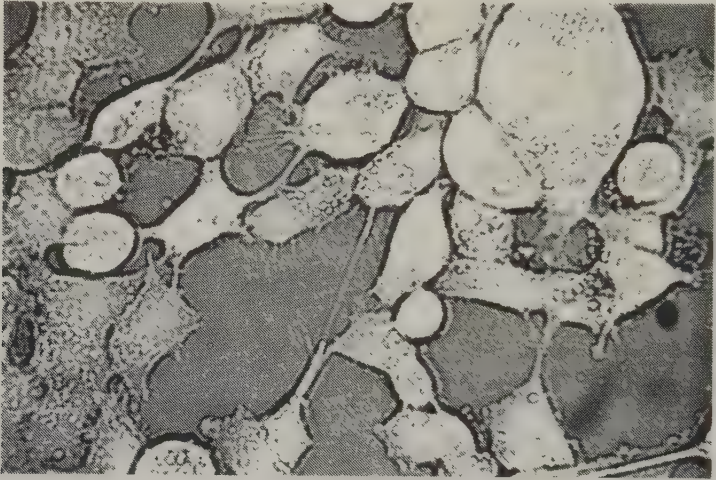


Abb. 8: DMSO-behandelte Kontrollzellen: keine avitalen (dunkel gefärbte) Zellen zu erkennen.

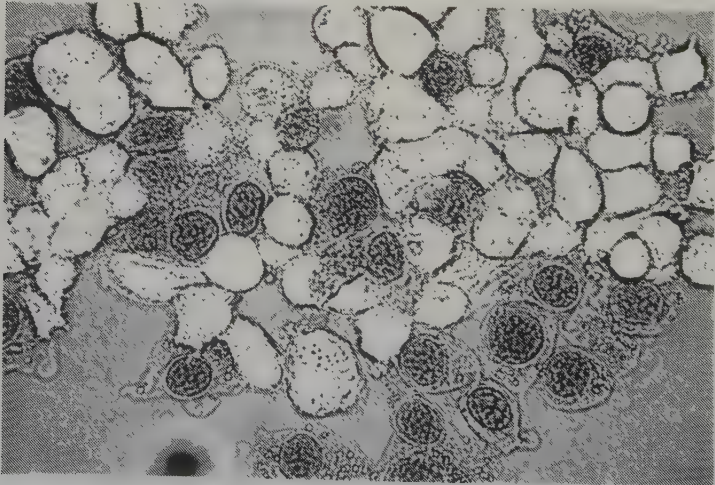


Abb. 9

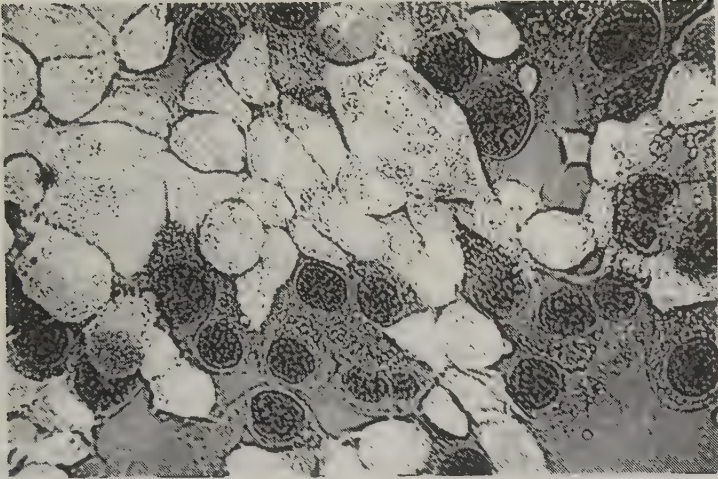


Abb. 10

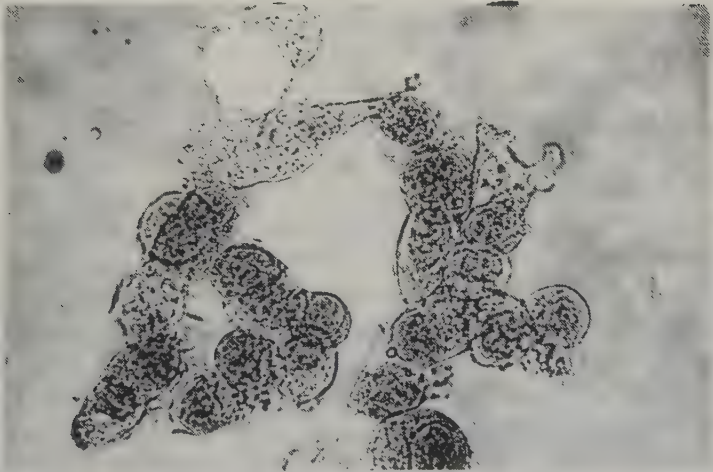


Abb. 11

Abb. 9: TDC, 5×10^{-5} M: etwa 25 % der Zellen sind avital.
Abb. 10: TDC, 5×10^{-4} M: etwa 30 % der Zellen sind avital.
Abb. 11: TDC, 5×10^{-3} M: etwa 90 % der Zellen sind avital.

4.2.5 Avitalitätsindex nach Gabe von VDC

Bei der höchsten Konzentration von VDC (10^{-4} M) gleicht der Befund bezüglich des Anteils avitaler Zellen dem Ergebnis nach hochkonzentrierter Gabe der beiden anderen Substanzen TDC und DDP. Auch bei VDC sind nach 12 Stunden keine vitalen Zellen mehr vorhanden, unmittelbar nach Substanzgabe sind nur 10 % der Zellen vital.

Bei der mittleren (10^{-5} M) und der niedrigsten Konzentration (10^{-6} M) ist kein kontinuierlicher Anstieg der Sterberate zu beobachten. Dem anfänglichen Anstieg in den ersten 12 Stunden bei der 10^{-5} -molaren VDC-Lösung von 23 % auf 28 % folgt ein Abfall auf 26 % nach 24 Stunden. Danach ist eine starke Erhöhung des Anteils avitaler Zellen zu erkennen. Beim 72h-Wert ist die Hälfte der Zellen tot. Im Vergleich zu den anderen Substanzen ist hier ein starker Anstieg des Avitalitätsindex zwischen 0 und 72 Stunden zu verzeichnen. Der Anstieg beträgt 27 %, der der Kontrollpopulation hingegen nur 6 %.

Die Veränderung im Avitalitätsindex bei der niedrigen Konzentration (10^{-6} M) folgen dem Verlauf bei der mittleren Konzentration. Der Anteil der avitalen Zellen ist zwar immer geringer als beim Versuchsansatz mit der 10^{-5} -molaren VDC-Lösung, jedoch sind die anfänglichen Schwankungen etwas stärker ausgeprägt. Am Ende der Exposition sind zunächst 15 % der Zellen avital, wobei sich dieser Anteil an avitalen Zellen in den nächsten 12 Stunden bis auf 25 % vergrößert.

Auch hier erfolgt im Anschluß daran eine Abnahme auf das Minimum von 19 % nach 24 Stunden. Die Anzahl der toten

Avitalitätsindex
von
KB-Zellen
nach
(C₅H₅)₂VCl₂-Behandlung

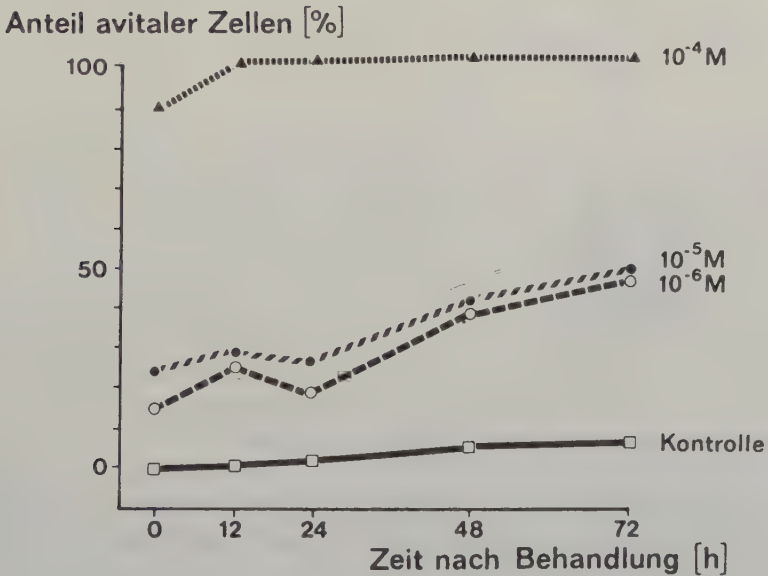


Abb. 12:

Darstellung der Avitalitätsindices von KB-Zellen nach VDC-Exposition in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit t nach Beendigung der Substanzexposition.

Zellen steigt dann wieder stark an, so daß nach 72 Stunden 48 % aller Zellen avital sind. Der Anstieg der Sterberate zwischen dem 0h-Wert und dem 72h-Wert ist mit 33 % der höchste im gesamten Versuch.

4.3 Lichtmikroskopische Befunde

Wie dem Kapitel 3.5 und der Tabelle II zu entnehmen ist, wurden die lichtmikroskopischen Untersuchungen unmittelbar nach Substanzentfernung sowie 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Beendigung der Substanzexposition vorgenommen. Aus Vergleichsgründen soll im folgenden Abschnitt zunächst die Normalstruktur der KB-Zellen beschrieben werden.

4.3.1 Normalstruktur der KB-Zellen

Die KB-Zellen besitzen im gesamten eine rundliche Form. Im Vordergrund der lichtmikroskopischen Betrachtung steht der Nucleus, der vom Zytoplasma durch eine dünne Verdichtungslineie getrennt ist, wobei sich diese nicht stark gegenüber dem Kernmaterial abhebt. Die Kerne sind überwiegend rund, teilweise oval und nierenförmig. Vereinzelt sind auch Kerne mit einer leicht abgerundeten Dreiecksform zu beobachten. Das Karyoplasma ist dunkel getüpfelt und weist teilweise feine, parallel zueinander verlaufende, strichförmige Verdichtungen auf (Abb.13-15).

Im Kern befinden sich die Nucleoli, die als dunkle, meist rundliche, jedoch oft auch als ausgefrante Flecken imponieren. Sie lassen aber kein einheitliches Strukturbild erkennen und beinhalten vereinzelt noch kleine punktförmige Strukturen. Auch die Anzahl der Nucleoli pro Zellkern ist sehr unterschiedlich, oft lassen sich drei Nucleoli im Kern finden, die an den Ecken eines gedachten Dreieckes postiert sind (Abb.16).

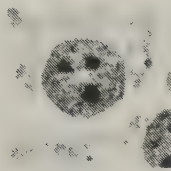


Abb. 13

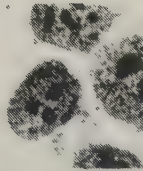


Abb. 14

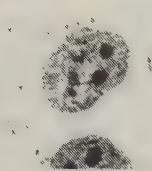


Abb. 15

Abb. 13 - 15: unterschiedliche Kernstrukturen bei unbehandelten KB-Zellen; $V = 1000$.

Abb. 13 runder Kern

Abb. 14 ovaler Kern

Abb. 15 nierenförmiger Kern

Abb. 16: Nucleus einer unbehandelten KB-Zelle mit eingezeichneten Verbindungslinien zwischen den drei Nucleoli; $V = 1700$.



Darüber hinaus sind aber gelegentlich auch relativ große Kerne mit zwei oder vier Nucleoli zu sehen. Beim Vorhandensein von vier Nucleoli ist oft die geometrische Anordnung in Form eines Quadrates auffällig. Die Größe des Kernels scheint aber in keinem exakten Verhältnis zur Anzahl der Nucleoli zu stehen.

Das Zytoplasma der KB-Zellen besteht aus einer nicht gleichmäßig strukturierten, aber feinen Grundsubstanz und ist daher eher unauffällig. Mit Hilfe des Lichtmikroskopes allein können detaillierte Strukturen im Zytoplasma nicht aufgezeigt werden.

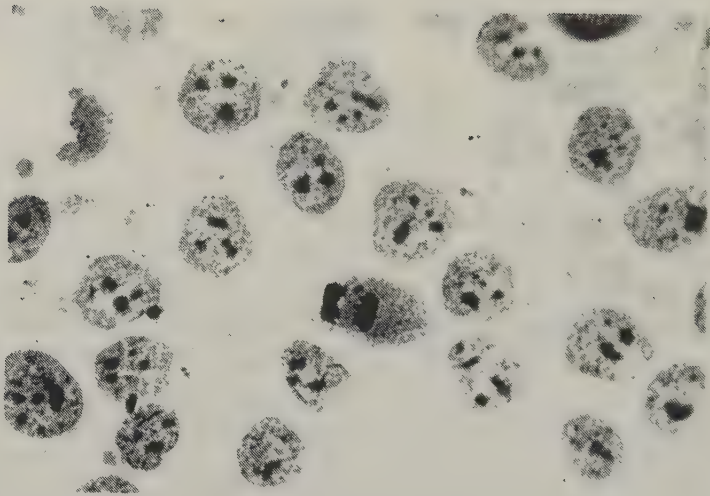


Abb. 17: Unbehandelte KB-Zellen mit einer in der Mitte sichtbaren Anaphase; V = 1000.

4.3.2 Struktur der KB-Zellen nach VDC-Behandlung

Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden unterschiedliche Konzentrationen (10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M) von VDC bei konstanter Expositionszeit angewendet. Die morphologischen Veränderungen scheinen jedoch im Prinzip nicht von der Konzentration der applizierten Substanz abhängig zu sein. Die hier im folgenden aufgeführten Ergebnisse haben für alle Konzentrationswerte ihre Gültigkeit.

Unmittelbar nach Beendigung der Substanzexposition lassen sich lichtmikroskopisch noch keine morphologischen Veränderungen beobachten.

12 Stunden nach der Substanzentfernung läßt sich eine Steigerung der Mitoseaktivität erkennen. Insbesondere treten Metaphasen und Anaphasen vermehrt auf. Gekennzeichnet sind Metaphasen durch den in der Mitte des Kernes liegenden Mutterstern ("Monaster"), d.h. dadurch, daß sich die im Mikroskop als "dunkel gefärbte Stücke" darstellenden Chromosomen in der Äquatorialebene sternförmig angeordnet haben. Die Nucleoli sind zu diesem Zeitpunkt verschwunden, und die Kernmembran ist fragmentiert bzw. völlig aufgelöst. Die Anaphasen treten gehäuft auf, wobei in den Zellen der Anaphase das Auseinanderrücken—der Chromosomenhälften aus der Äquatorialebene zu den Zellpolen hin erkennbar ist ("Diaster"). Die vorher beschriebenen "dunkel gefärbten Stücke" weichen auseinander und wandern polwärts. Auffällige Mitoseanomalien sind nicht zu entdecken. Unabhängig von der veränderten Mitoseaktivität ist darauf hinzuweisen, daß sich jetzt die Verdichtungslineie um den Kern bei den nicht in Mitose stehenden Zellen (Interphasezellen) als deutlich erkennbarer dunkler Streifen zwischen Zyto- und Karyoplasma abhebt. Die Kernmembran scheint zu diesem Zeitpunkt bei den meisten Zellen dicker zu sein als bei unbehandelten Zellen (Abb.18,19).

24 Stunden nach Beendigung der Substanzexposition sind - ähnlich wie 12 Stunden nach Substanzgabe - vermehrt Meta- und Anaphasen vorhanden. Neben der gesteigerten Mitoseaktivität fallen zu diesen Untersuchungszeitpunkten auch fehlerhafte Kernteilungen auf. Diese Mitoseanomalien geben kein einheitliches Bild ab, sondern es tauchen viele unterschiedliche Mitosefiguren auf, z.B. schrumpfende Metaphasenfiguren oder Anaphasen mit zurückbleibenden Chromosomen in der Zellmitte (Abb.20).

Darüber hinaus lassen sich in manchen Zellen auch Chromosomen finden, welche sich während der Metaphase in der

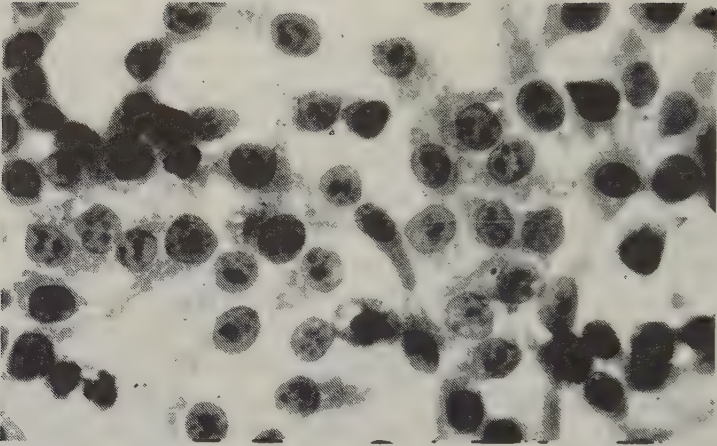


Abb. 18

Abb. 19

Abb. 18 und 19: KB-Zellen 12 Stunden nach Beendigung der VDC-Gabe - verstärkte Mitoseaktivität, Meta- und Anaphasen, V = 740.

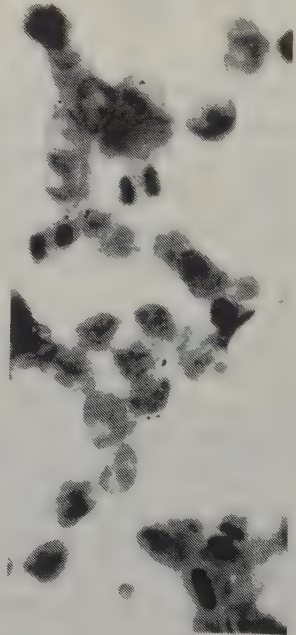


Abb. 20

Abb. 20: KB-Zellen 24 Stunden nach Beendigung der VDC-Gabe - schrumpfende Metaphasefigur; V = 1000.

Äquatorialebene angeordnet haben und in ihrer Gesamtheit V-förmig abgeknickt sind (Abb.21).

Weiterhin sind auch reichlich Zellen mit multipolaren Mitosefiguren vorhanden, insbesondere tri- und quadripolare mit häufig ungleicher Chromosomenverteilung in den einzelnen Polen (Abb.22). Denkbar wäre es, daß es sich wiederum um ein V-förmiges Abknicken handelt, welches jedoch auf eine Chromosomenhälfte begrenzt ist. Die zweite Chromosomenhälfte hat sich eventuell nochmals geteilt, so daß eine multipolare Mitosefigur entstanden ist. Möglicherweise führen auch andere Vorgänge zur Bildung dieser Mitosefiguren. Bei quadripolaren Zellen sind vier Chromosomenabschnitte vorhanden, die häufig noch nicht vollständig voneinander getrennt sind. Diese Abschnitte laufen in Richtung Zellmitte aufeinander zu und haben dort punktförmigen Kontakt. Das Erscheinungsbild dieser unvollkommenen Mitose läßt sich mit einem vierblättrigen Kleeblatt vergleichen (Abb.23).

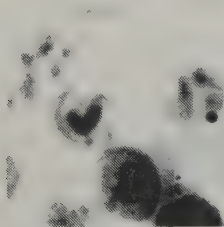


Abb. 21

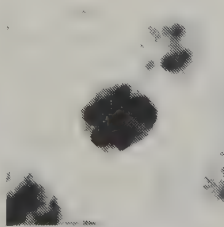


Abb. 22

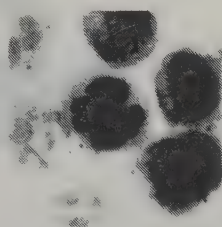


Abb. 23

Abb. 21 - 23:

KB-Zellen 24 Stunden nach Beendigung der VDC-Gabe - verschiedene Mitoseanomalien mit V-förmiger- und kleeblattförmiger Chromosomenanordnung; V = 1000.

Vorhanden sind auch dreipolige Zellen, die wiederum ein unterschiedliches Aussehen besitzen. Bei der in Abb.24 gezeigten dreipolaren Zelle sind keine Verbindungen mehr zwischen den einzelnen Chromosomenhäufchen vorhanden. Sie scheint sich also in einem späteren Teilungsstadium als die oben betrachtete kleeblattförmige Zelle zu befinden, bei der diese Verbindungen noch vorhanden waren.

Es sind aber auch wieder Zellen mit V-förmigen Elementen zu finden, von denen jedoch mehrere in einer Zelle auftreten. Die Spitze des "V" kann sowohl in Richtung auf die Zellmembran als auch zur Zellmitte hin weisen; letzteres tritt vorrangig auf (Abb.25).

Abschließend ist noch auf die vereinzeltten Ansätze zur Ausbildung von Riesenzellen, die für den letzten Untersuchungszeitpunkt ausführlich in ihrem Aussehen beschrieben werden, hinzuweisen.

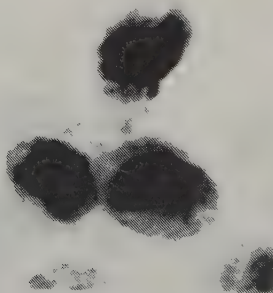


Abb. 24



Abb. 25

Abb. 24 und 25: KB-Zellen 24 Stunden nach VDC-Gabe - verschiedene Mitoseanomalien: - tripolare Mitose, Telophase mit Übergang zur Zytokinese-phase (Abb. 24)
multipolare Mitosen (Abb. 25)
 $V_{\text{Abb. 24}} = 1700$,
 $V_{\text{Abb. 25}} = 1000$.

48 Stunden nach Beendigung der Substanzgabe scheint die Mitoseaktivität wieder auf Normalwerte zurückzugehen, gleichzeitig sind kaum noch Mitoseanomalien zu beobachten.

Während unbehandelte Zellen meistens drei Nucleoli besitzen, ist es beim 48h-Untersuchungszeitpunkt auffällig, daß viele Zellen mit normal groß erscheinendem Kern nur noch einen Nucleolus haben. Dieser ist meistens größer als jener der unbehandelten Zellen und erscheint außerdem unscharf begrenzt bzw. verschwommen (Abb.28).

Manche Zellen zeigen eine starke Chromatinklumpung (Abb.27), andere weisen Kerninvaginationen auf, wobei der Zellkern meistens nur einen Nucleolus hat. Oft sind auch Zellen zu beobachten, bei denen die Kernteilung nur unvollständig vollzogen zu sein scheint.

Zu diesem Untersuchungszeitpunkt hebt sich weiterhin die Kernmembran in Interphasezellen stark sowohl vom Zytoplasma als auch vom Kernmaterial ab, wohingegen die Kernmembran bei unbehandelten Zellen unauffällig ist. Es treten jetzt schon vereinzelt Riesenzellen auf, die unten ausführlich beschrieben werden. Als letztes soll auf die öfters veränderte Zellform hingewiesen werden: Die anfänglich immer runden Zellen erscheinen jetzt teilweise länglich, dreieckig bzw. mehreckig, wobei zumeist die Ecken bzw. Zellenden zu langen, sich verdünnenden Fortsätzen auslaufen (Abb.26 - 28).

Beim letzten Untersuchungszeitpunkt, 72 Stunden nach Substanzgabe, stehen die gebildeten Riesenzellen im Vordergrund. Schon nach 24 Stunden waren erste Hinweise für die Entstehung von Riesenzellen gegeben. Bei diesen Riesenzellen handelt es sich meistens um ein- bzw. zweikernige; drei-, vier- oder mehrkernige sind nur sehr selten zu beobachten. Bei den einkernigen Riesenzellen ist nicht nur das Zytoplasma vergrößert, sondern auch der Zellkern, der

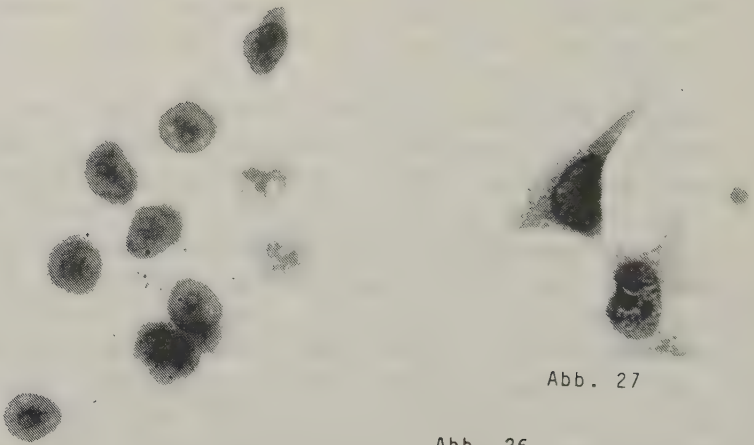


Abb. 27

Abb. 26

Abb. 26 - 28: KB-Zellen 48 Stunden nach VDC-Gabe.

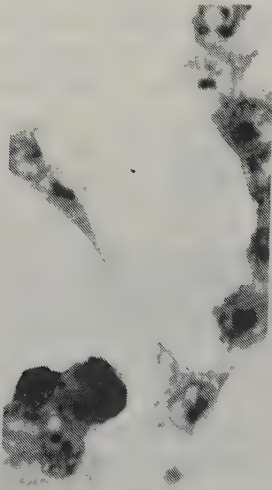


Abb. 28

Abb. 26: KB-Zellen mit verdickter

Kernmembran;

V = 740.

Abb. 27: KB-Zellen mit Chromatin-

klumpung und Zytoplasmaaus-

läufern; V = 1000.

Abb. 28: KB-Zellen mit mehreren

eckigen Zytoplasma- aus-

läufern und nur einem

Nucleolus, V = 740.

von einer stark verdichteten Kernmembran umgeben ist. Im Kern ist meist nur ein Kernkörperchen vorhanden, das ungefähr so groß ist wie der gesamte Zellkern einer unbehandelten KB-Zelle. Sowohl der Nucleus als auch der Nucleolus dieser einkernigen Riesenzellen haben eine runde Gestalt.

Der Nucleolus ist stark verdichtet und hat mehrere Verbindungsstellen zu der hervortretenden Kernmembran. Diese Kern- bzw. Zellveränderung erinnert an ein Wagenrad (Abb.29).

Neben diesen einkernigen Riesenzellen treten auch zweikernige auf, die zahlenmäßig den größeren Anteil ausmachen. Dabei sind wiederum unterschiedliche morphologische Ausprägungen zu beobachten. Die einfachste Art ist die zweikernige Riesenzelle, bei der die Kerne zwar nebeneinander liegen, aber deutlich jeweils ihre eigene Kernmembran besitzen. Weiterhin sind auch zweikernige Riesenzellen zu finden, bei denen die Kerne teilweise noch untereinander Verbindung in Form von Karyoplasma-Brücken haben. Letztlich läßt sich lichtmikroskopisch eigentlich keine Aussage machen, ob es sich dabei um eine unvollkommene Kernteilung oder um eine starke Kernlappung handelt (Abb.30-33).

Abb. 29



Abb. 29 - 33: KB-Zellen 72 Stunden nach VDC-Gabe; V = 740.

Abb. 29: Riesenzelle, einkernig - Wagenradstruktur

Abb. 30 - 33: Riesenzelle, mehrkernig



Abb. 30



Abb. 31



Abb. 32

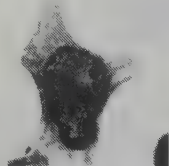
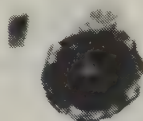


Abb. 33

Bei den ein- und zweikernigen Riesenzellen ist die Kernmembran rund und glatt gestaltet. Bei den seltenen drei- und vierkernigen Riesenzellen ist die gewellte, teilweise gezackte Kernmembran auffällig, wobei die runde Form des Kerns oft gegen eine ovale ausgetauscht ist (Abb.34).

Abb. 34:

KB-Zellen 72 Stunden nach VDC-Gabe:
Riesenzelle, dreikernig mit gewellter
Kernmembran; V = 740.



Auffällig sind die Veränderungen des Zytoplasmas. Das bei unbehandelten Zellen unauffällige Zytoplasma ist 72 Stunden nach Beendigung der Substanzexposition von Vakuolen durchsetzt. Diese befinden sich sowohl in den Riesenzellen, als auch in den übrigen, nicht riesenhaft vergrößerten Zellen. Die schon nach 48 Stunden beschriebenen Zytoplasmafortsätze treten weiterhin auf (Abb. 35, 36).

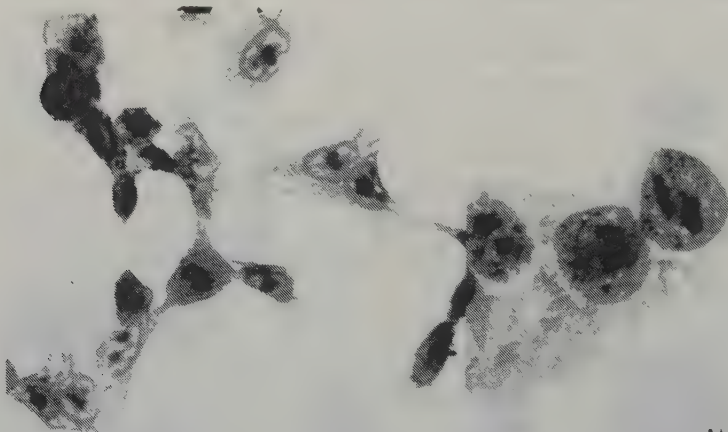


Abb. 35

Abb. 36

Abb. 35 und 36: KB-Zellen 72 Stunden nach VDC-Gabe:
Riesenzellen mit starken Chromatinklumpungen, Vakuolen im
Zytoplasma und auslaufenden Zellfortsätzen;

V_{Abb.35} = 740, V_{Abb.36} = 1000.

4.3.3 Struktur der KB-Zellen nach TDC und DDP Behand- lung -----

Die lichtmikroskopische Untersuchung der mit TDC oder DDP behandelten Zellen zeigt, daß die morphologischen Veränderungen nach TDC- und DDP-Applikation sehr ähnlich denen nach VDC-Gabe sind.

Sofort nach der Entfernung von TDC und DDP sind lichtmikroskopisch noch keine Veränderungen zu erkennen. Eine verstärkte Mitoseaktivität ist 12 Stunden nach Beendigung der Substanzexposition aufzuzeigen, wobei auch hier ein vermehrtes Auftreten von Meta- und Anaphasen zu beobachten ist. Multipolare Mitosefiguren, schrumpfende Metaphasen und andere Mitoseanomalien sind nach 24 Stunden zahlreich vorhanden, nehmen jedoch nach 48 Stunden wieder ab. Weiterhin erscheint beim 48h-Untersuchungszeitpunkt die Kernmembran optisch wesentlich dichter, und die Anzahl der im Kern befindlichen Nucleoli verringert sich bis auf ein Kernkörperchen. Daneben fallen die Chromatinklumpungen im Zellkern auf. Vakuolen bilden sich im Zytoplasma nach 72 Stunden. Außerdem treten zu diesem Zeitpunkt ein- und zweikernige Riesenzellen auf. Das Aussehen dieser Riesenzellen stimmt mit dem Erscheinungsbild der nach VDC-Behandlung beschriebenen Riesenzellen überein.

Zusammenfassend sind die morphologischen Veränderungen für alle drei Substanzen in Tabelle III aufgeführt.

Zeitpunkt nach Substanzentfernung	Lichtmikroskopische Veränderungen
12 h	Zunahme der Mitoseaktivität, insbesondere vermehrtes Auftreten von Meta- und Anaphasen
24 h	Auftreten von Mitoseanomalien: - multipolare Mitosefiguren - Anaphasen mit in der Zellmitte zurückbleibenden Chromosomen - schrumpfende Metaphasen
48 h	Mitoseindex geht auf Normalwerte zurück Kerninvaginationen Vorhandensein zumeist singulärer, verschwommen begrenzter, großer Nucleoli in den Kernen Optisch verdichtet und verdickt erscheinende Kernmembran Kaum noch Mitoseanomalien Chromatinklumpungen
72 h	Auftreten von ein- und zweikernigen Riesenzellen Kerneinschnürungen Auftreten von Vakuolen im Zytoplasma

Tabelle III: Überblick über die lichtmikroskopischen Veränderungen an KB-Zellen nach Gabe von VDC, TDC und DDP.

4.4 Elektronenmikroskopische Befunde

4.4.1 Normalstruktur der KB-Zellen

Die Beschreibung der Normalstruktur der KB-Zelle ist aufgrund der generellen Variabilität von Tumorzellen schwierig.

Die KB-Zelle stellt sich elektronenoptisch als eine große, teilweise längliche bzw. pleomorphe Zelle dar. Die Zelloberfläche der meisten Zellen ist mit Mikrovilli in unterschiedlicher Anzahl und Aussehen bedeckt. Es handelt sich hierbei um schlanke Zellfortsätze, die die Zelloberfläche erheblich vergrößern. Bei den KB-Zellen sind diese Zellfortsätze sehr unregelmäßig angeordnet. Bei einigen Zellen lassen sich keine Mikrovilli erkennen, bei anderen treten sie sporadisch auf, bei den meisten jedoch ist ein dichter Besatz vorhanden. Im morphologischen Bild lassen sich zwei Typen unterscheiden: Meistens liegen langgestreckte, gleichmäßig breite, "fingerförmige" Zellausstülpungen vor, daneben sind jedoch auch keulenförmige Mikrovilli zu erkennen (Abb.45, 46). Dieses Erscheinungsbild könnte schnittechnisch bedingt sein.

Die Zytoplasmamembran stellt sich als elektronendichte, verhältnismäßig glatte Linie dar, die die Zytoplasmaausstülpungen bzw. Zellfortsätze ohne Unterbrechung umschließt. Die Zellen sind teilweise untereinander breitbasig verbunden. Diese feste Verbindung wird hauptsächlich durch Desmosomen erreicht (Abb.37, 43). Diese Desmosomen sind aus zwei festen Platten aufgebaut, die jeweils an zwei gegenüberliegenden zu verbindenden Zytoplasmamembranen sitzen. Diese auch als Halbdesmosomen bezeichneten Platten werden von einer Kittsubstanz zusammengehalten. Zum Zytoplasma hin ist an den Halbdesmosomen elektronendichtes Material zu erkennen. Es sind darin

Tonofilamente befestigt, die ihre Ausläufer in Richtung Zellmitte haben; die dunkle, verschwommene Struktur an der Zytoplasmagrenze läßt sich dadurch erklären.

Bei der Betrachtung der unbehandelten KB-Zellen steht der relativ auffällige Kern gegenüber dem unscheinbaren Zytoplasma im Vordergrund. Der Kern ist von einer Kernhülle umgeben, die in eine innere Kernmembran, einen perinukleären Raum und eine äußere Kernmembran zu unterteilen ist. Dieses mit Poren versehene Doppelmembransystem ist gut ausgeprägt. Der inneren Kernmembran ist teilweise leicht kondensiertes Chromatin aufgelagert (Abb.42). Diese Chromatinauflagerung ist nicht gleichmäßig dicht, sondern häufig perlschnurartig verdichtet (Abb.38, 40, 41). Bei den meisten menschlichen Tumorzellen ist der Zellkern nicht einheitlich rund. Dieses ist auch den KB-Zellen eigen, die meistens einen gewellten, gezackten oder auch eingekerbten Zellkern aufweisen. Weiterhin ist die exzentrische Lage der Nucleoli als Zeichen einer Tumorzelle oder einer schnellwachsenden Zelle zu werten (BERNARD¹²). Die Anzahl der Nucleoli ist dabei schwankend; oft sind zwei oder drei in einem Zellkern angeschnitten. Bei den Nucleoli der KB-Zellen handelt es sich um einen kompakten Kernbestandteil, der kaum Netzwerkstruktur aufweist. Das Nucleolonema ist dementsprechend wenig durchsetzt mit hellen Bezirken. Das Strukturbild des Nucleolus stellt sich trotzdem nicht einheitlich dar. Ein bis zwei Partes amorphae sind in einem Nucleolus zu erkennen (Abb.38, 44). Die Pars fibrosa lagert sich den kugelförmigen, aus feingranularem Material geringer Dichte bestehenden Partes amorphae an und grenzt diese kräftig gegen die Pars granulosa des Nucleolus ab.

Im Zytoplasma lassen sich bei den Zellorganellen kaum auffällige Strukturen finden: Die Mitochondrien sind als meistens rundliche, jedoch auch als längliche Zellbestandteile zu erkennen. Sie sind in gleichmäßiger Anordnung

überall im Zytoplasma zu finden. Die Anzahl der Mitochondrien erscheint im Vergleich zu anderen Epithelzellen hoch. Das von LAPIS und BERNARD³⁷ aufgezeigte Bild der Mitochondrien kann bestätigt werden. Die Cristae in den Mitochondrien sind oft schlecht zu identifizieren, da sie entweder nicht vorhanden oder schlecht entwickelt sind (Abb.40).

Neben den Mitochondrien ist das endoplasmatische Retikulum leicht zu differenzieren. Es ist in unregelmäßiger Anordnung überall im Zytoplasma vorhanden, jedoch nicht als ein sich über die ganze Zelle erstreckendes Röhrensystem. Diese Zellstruktur ist vielmehr stets in Form nur kurzer Abschnitte sichtbar. Die Membranen des endoplasmatischen Retikulums weisen an der Innenseite der Zisternen keine besondere Struktur auf. Jedoch sind der Oberfläche der zum Grundplasma liegenden Membranseite zahlreiche Granula aufgesetzt. Bei den Granula handelt es sich um Ribosomen. Aufgrund der aufgesetzten Ribosomen wird dieses endoplasmatische Retikulum als granuliertes bzw. rauhes ER (rER) bezeichnet. In der Grundstruktur des Zytoplasma lassen sich weiterhin auch unabhängig vom rauhen endoplasmatischen Retikulum deutlich einzelne oder auch in Gruppen angeordnete Granula erkennen. Bei diesen Granula handelt es sich ebenfalls um Ribosomen. Da sie aber keinen Kontakt zum endoplasmatischen Retikulum haben, werden sie als freie Ribosomen bezeichnet. Neben den häufig vorhandenen Mitochondrien sind Lysosomen in den KB-Zellen regelmäßig zu finden (Abb.39). Die Lysosomen weisen kein einheitliches Strukturbild auf, d.h. sie zeigen in ein- und derselben Zelle starke Variationen bezüglich ihrer Form und ihres inneren Aufbaus.

Vereinzelte sind auch Fetteinlagerungen im Zytoplasma zu beobachten, wobei es sich hierbei nach LANE und NOVICKOFF³⁶ um Triglyceride handeln dürfte (Abb.42). Die von KUMEGAWA, CATTONI und ROSE^{34, 35} beschriebenen "annulate lamellae" konnten bei den vorliegenden Zell-

schnitten nicht nachgewiesen werden. Weiterhin konnten in der Normalstruktur der KB-Zelle keine Golgi-Komplexe bzw. einzelne Bestandteile daraus aufgezeigt werden.

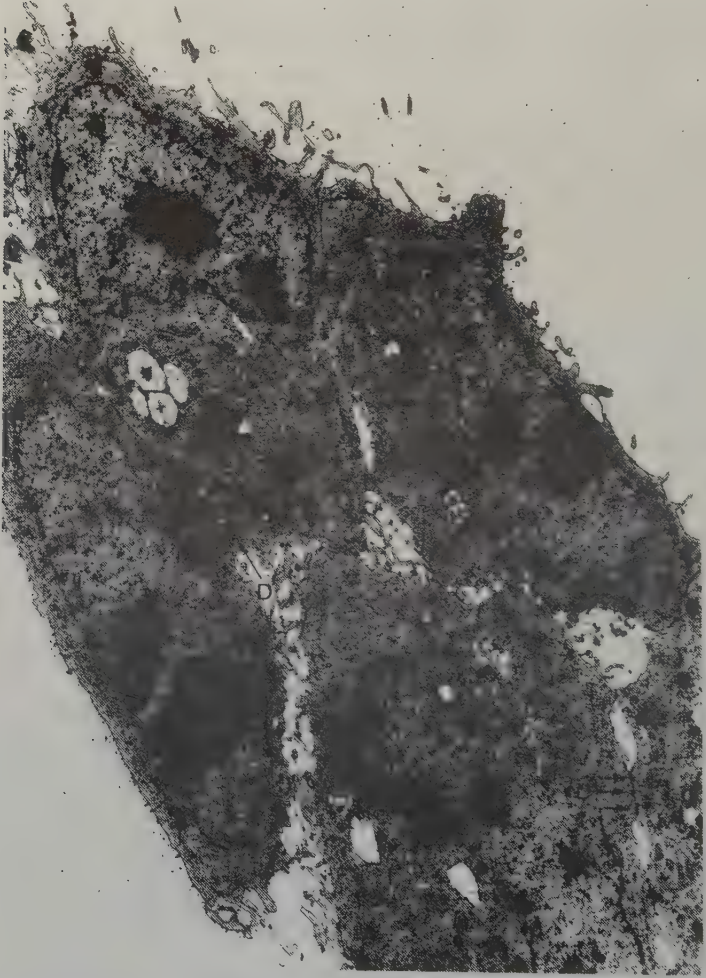


Abb. 37: Gesamtübersicht über unbehandelte Zellen;
D-Desmosomen (→); V = 7200.

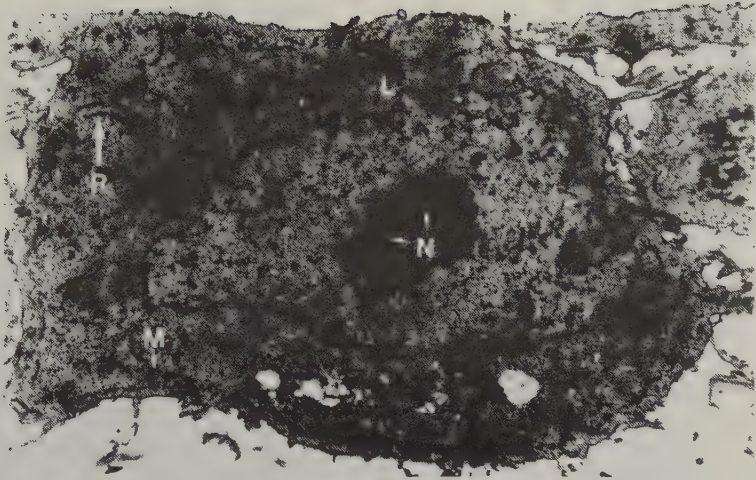


Abb. 38: Unbehandelte KB-Zelle - Mitochondrien (M), raues endoplasmatisches Retikulum (R), Nucleolus (N) mit Partes amorphae (→), Lysosom (L); V = 9600.

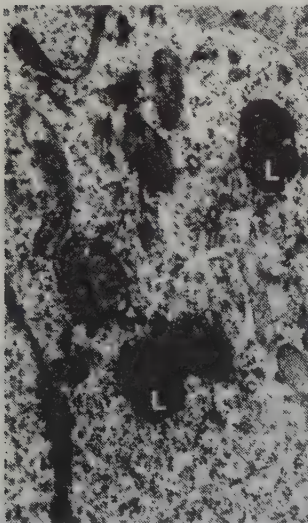


Abb. 39

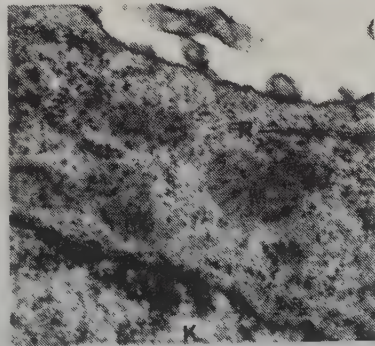


Abb. 40

Abb. 39, 40: Ausschnitt aus un-
behandelter KB-Zelle - Mitochon-
drium (M), raues endoplasma-
tisches Retikulum (R), Kern (K)
mit Kernmembran, Lysosom (L);

V_{Abb.39} = 39500,

V_{Abb.40} = 42000.



Abb. 41

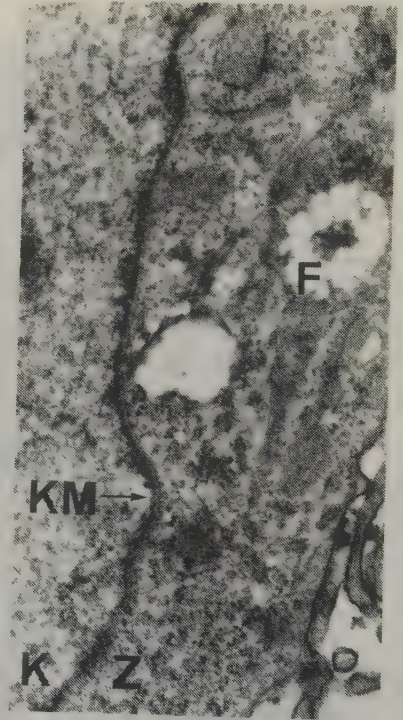


Abb. 42

Abb. 41, 42: unbehandelte KB-Zelle - perlchnurartige Chromatinauflagerungen (→) an der inneren Kernmembran (KM), Kern (K), Zytoplasma (Z), Fetteinlagerung (F); V = 37300.

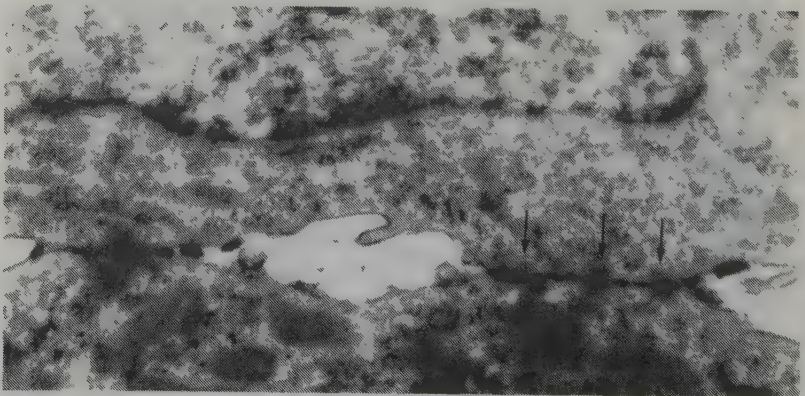


Abb. 43: Ausschnitt aus unbehandelter KB-Zelle - Desmosom (→); V = 44000.

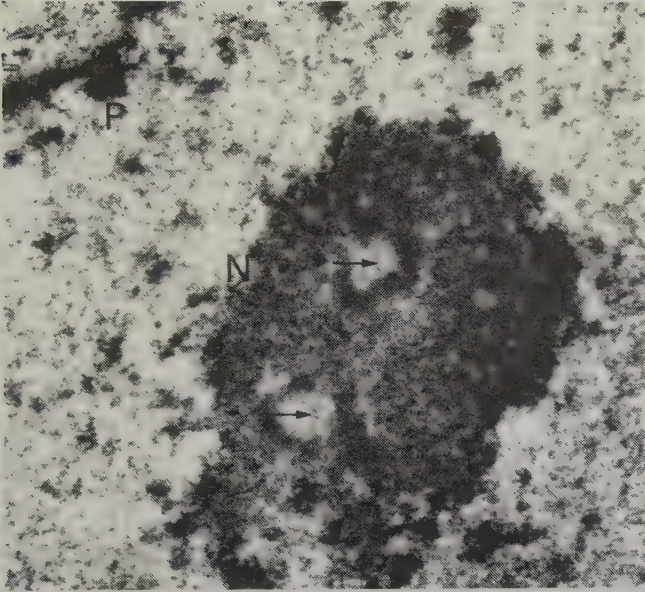


Abb. 44: Ausschnitt aus unbehandelter KB-Zelle - Nucleolus mit zwei Partes amorphae ($\rightarrow$), perlschnurartige Chromatinauflagerung (P); $V = 39400$.

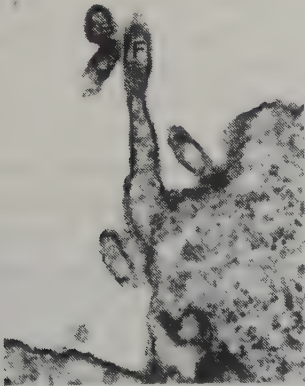


Abb. 45

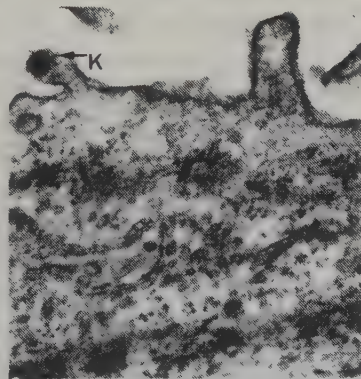


Abb. 46

Abb. 45, 46: Ausschnitt aus unbehandelter KB-Zelle, fingerförmiger Mikrovillus (F), keulenförmiger Mikrovillus (K); $V_{Abb.45} = 49200$, $V_{Abb.46} = 59000$.

4.4.2 Struktur der KB-Zelle nach Behandlung mit Metalloiden-dichloriden

4.4.2.1 Strukturänderung nach Gabe einer 10^{-6} M VDC-Lösung

Nach 0 Stunden

Unmittelbar nach Beendigung der Substanzexposition (0h) ist bei einem Teil der Zellen eine relativ auffällige Veränderung an der Kernmembran zu beobachten: Die bei der unbehandelten Zelle nur leicht gewellte Kernmembran zeigt kurz nach Beendigung der VDC-Gabe deutlich ausgeprägte Membraneinstülpungen und nimmt dem Kern dadurch sein ursprünglich annähernd rundes Aussehen (Abb.47).

Der Kern beinhaltet meist einen oder zwei Nucleoli, die sich in ihrem Aussehen nicht stark von dem der unbehandelten Zellen unterscheiden. Teilweise scheint sich einer der Nucleoli vergrößert zu haben, ohne jedoch seine insgesamt kreisförmige Gestalt aufzugeben. Die Partes amorphae der Nucleoli sind häufig nicht mehr so stark gegen die restliche Nucleolusstruktur abgegrenzt; die sonst klaren Grenzen sind verschwommen (Abb.47). Leichte Chromatinauflagerungen an der inneren Kernmembran sind zu erkennen.

Im Zytoplasma ist zwar die Anzahl der Mitochondrien nicht verändert, jedoch imponieren einzelne Mitochondrien vergrößert, behalten allerdings ihr zuerst rundes Aussehen bei. Lysosomen und Strukturen des rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) sind kaum vorhanden.

Nach 3 Stunden

Beim nächsten Untersuchungszeitpunkt, 3 Stunden nach Beendigung der Substanzexposition, ist die Kernmembran in gleicher Weise gewellt und invaginiert. Die Struktur der Nucleoli erscheint deutlich aufgelockert; eine Netzwerkstruktur ist gut zu erkennen, die Abgrenzung der Partes

amorphae ist - ähnlich dem Oh-Bild - verschwommen. Die Nucleoli erscheinen in ihrer Gesamtheit durch die Auflockerung wesentlich heller als bei der unbehandelten Zelle.

Im Zytoplasma haben sich die Mitochondrien vergrößert, teilweise ihr rundliches Aussehen verloren und liegen oft als ovale oder längliche Zellorganellen vor. Strukturen des rER sind auch zu diesem Zeitpunkt kaum vorhanden, jedoch steigt die Lysosomenzahl leicht an.

Besonders auffällig ist im Zytoplasma das gelegentliche Auftreten eines hellen Hohlraums, der durch eine feine, sehr elektronendichte Membran gegen das übrige Zytoplasma abgegrenzt wird. In diesem Hohlraum sind kleine, teilweise aneinandergelagerte, oval gestaltete Partikel eingeschlossen, die an das Aussehen kleiner Viren erinnern. Diese virusähnlichen Partikel sind nach keiner exakten geometrischen Anordnung in dem membranumschlossenen Raum eingelagert und füllen diesen Raum nicht vollständig aus. Sie haben einen Durchmesser von etwa 20-30 nm (Abb.49). Diese ungewöhnliche morphologische Struktur scheint mit keiner anderen Zellorganelle in Kontakt zu stehen und wurde bei unbehandelten KB-Zellen zu keinem Zeitpunkt beobachtet.

Die Anzahl und Größe der zytoplasmatischen Fetttropfen, die Mikrovilli an der Zelloberfläche sowie das Kern-Zytoplasma-Verhältnis ist zu diesem Untersuchungszeitpunkt im Vergleich zur unbehandelten Zelle unverändert.

Nach 6 Stunden

6 Stunden nach Beendigung der VDC-Gabe sind sowohl im Kern als auch im Zytoplasma starke Veränderungen zu verzeichnen. Die nach 3 Stunden vorhandenen leichten Chromatinauflagerungen verschwinden bei der einen Hälfte der Zellen teilweise vollständig, so daß die Kernmembran ohne jegliche Chromatinanlagerung als gleichmäßig dünner "Strich" in Erscheinung tritt. Die Kerne sind aufgrund der

fehlenden Chromatinzusammenballung im gesamten transparenter (Abb.54). Bei der anderen Hälfte der Zellen ist die Struktur der Kernmembran und das Aussehen des Chromatins identisch mit der Normalstruktur, d.h. die perlschnurartigen Chromatinauflagerungen an der Kernmembranninnenseite sind vorhanden. Ähnlich dem 3h-Befund liegen im Kern entweder zwei kleinere oder ein größerer Nucleolus, wobei auch hier die Abgrenzung der Partes amorphae gegenüber dem übrigen Nucleolus verschwommen erscheint (Abb.48).

Besonders auffällig sind die intranucleären Ausläufer der Kernmembran, die sich als Doppelmembransystem von der inneren Kernmembran im 45°- bis 90°-Winkel hakenförmig ausstülpfen (Abb.50,51). Bei vorhandenen Zytoplasmavaginationsen in den Kern sind diese intranucleären Membranausstülpungen in gleicher Weise zu beobachten (Abb.54). Auch im Zytoplasma sind neue Strukturen zu erkennen: Im Vordergrund steht hierbei die auffällige Einlagerung von Glykogen. Es handelt sich dabei meistens um große, rundliche und helle Bezirke, die mit dunkleren Glykogenpartikeln besetzt sind. Diese kreisförmige Gestalt hebt sich aufgrund ihres hellen Hintergrundes deutlich vom übrigen Zytoplasma ab. Die kreisförmige Anlagerung von elektronendichten freien Ribosomen um diese hellen Glykogenbezirke verstärkt das auffällige Bild (Abb.52). Daneben ist auch ein deutlicher Anstieg der Lysosomenzahl zu verzeichnen, vor allem in den Zellen, die Glykogeneinlagerungen aufweisen; häufig liegen die Lysosomen in unmittelbarer Nähe zum Glykogen.

Neben der Vermehrung der Lysosomen ist auch ein zahlenmäßiger Anstieg der Mitochondrien zu beobachten. Es hat sich jedoch nicht nur ihre Anzahl, sondern auch ihre Form verändert. Die aufgequollenen Mitochondrien liegen jetzt in runder, länglicher, tropfen-, hufeisen- oder keulenförmiger Gestalt vor (Abb.52). Vereinzelt sind die Cristae mitochondriales zu erkennen, oft liegt das Mitochondrium als gequollene, verschwommene Masse vor. Das

rER ist wiederum wenig ausgeprägt. Abschließend soll erwähnt werden, daß die Kerngröße im Verhältnis zum Zytoplasma zuzunehmen scheint.

Nach 9 Stunden

Bei diesem Untersuchungszeitpunkt ist keine Chromatinauflagerung an der inneren Kernmembran vorhanden. Auch im übrigen Karyoplasma sind keine Chromatinklumpungen zu erkennen (Abb.53,54). In dem Nucleoli dagegen fallen neben den zerrissenen Partes amorphae Gebiete im Nucleolus mit Karyoplasmastruktur auf. Die Nucleoli stellen also keinen einheitlichen, verbundenen Kernbestandteil mehr dar (Abb.54).

Im Zytoplasma ist wie bei den früheren Untersuchungszeitpunkten das vermehrte Auftreten von unterschiedlich geformten Mitochondrien zu beobachten. Daneben ist eine Veränderung am rER erwähnenswert: Im Gegensatz zu den bisherigen Beobachtungen tritt nach 9 Stunden das Zisternensystem des rER vermehrt auf, wobei sich - ähnlich wie bei den unbehandelten Zellen - nur kurze, ungeordnete übereinanderliegende Abschnitte finden (Abb.53). Außerdem hat sich die Anzahl der an der Zelloberfläche sitzenden Mikrovilli augenscheinlich verringert. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis scheint sich zugunsten des Kerns verändert zu haben.

Nach 12 Stunden

12 Stunden nach Beendigung der Substanzgabe ist schon in den Übersichtsaufnahmen der transparente, homogen erscheinende Kern auffällig; Chromatinklumpungen bzw. Chromatinauflagerungen an der Kernmembran sind nicht vorhanden. Die Kernmembran weist vielfach Invaginationen des Zytoplasmas auf. Weiterhin ist bei niedrigen Vergrößerungen das Phänomen der zonalen Gliederung der Zelle in drei zirkular angeordnete Areale gut zu erkennen: Der zentrale Abschnitt besteht aus dem Kern, der periphere beinhaltet Zytoplasma, in dem fast keine Zellorganellen vorhanden

sind; die Zellorganellen ziehen sich bandförmig um den Kern und bilden damit den mittleren Abschnitt (Abb.55). Der Nucleolus ist auch bei diesem Zeitwert aufgelockert und weist zerrissene, unscharf begrenzte Partes amorphae auf.

Im Zytoplasma stehen die zahlen- und volumenmäßig erheblich angestiegenen Mitochondrien im Vordergrund. Die Form der teilweise stark gequollenen Mitochondrien unterliegt starken Variationen: Im allgemeinen sind bei ihnen weder die äußere Membran noch irgendwelche Cristastrukturen zu erkennen. Demgegenüber weist das rER kaum Veränderungen gegenüber der Normalstruktur auf. Die Lysosomen erscheinen dicker und zahlenmäßig vermehrt. Weiterhin treten neben vereinzelt Fetttropfchen die schon vorher beschriebenen, mit virusähnlichen Partikeln angefüllten Hohlräume auf, die auch hier mit einer einfachen, scharf konturierten Membran gegen das übrige Zytoplasma abgegrenzt sind.

Nach 24 Stunden

Einen Tag nach Substanzgabe sind eine leichte Chromatinklumpung im Karyoplasma und kleine perlschnurartige Chromatinauflagerungen an der Kernmembran zu beobachten. Die Anzahl der Mitochondrien bleibt im Vergleich zu den Kontrollzellen weiterhin erhöht. Im Gegensatz zum 12h-Wert ist das rER stärker entwickelt und weist längere Abschnitte auf. Die zonale Zellgliederung in drei Abschnitte ist eigentlich auch bei diesem Zeitwert erhalten, jedoch ziehen die ausgezogenen Zisternen des rER in den peripheren Abschnitt hinein (Abb.56). Fetteinlagerungen und Vakuolenbildungen nehmen zu, die Anzahl der Mikrovilli an der Zelloberfläche nimmt stark ab.

Nach 48 Stunden

Die Zellkontakte fangen 2 Tage nach Beendigung der Substanzgabe an, sich aufzulockern. Die Zellmembran scheint sich dabei vom Zytoplasma der Zelle zu lösen und sich zu verknäueln (vergleichbar dem Aussehen in Abb.75). Der

Kern ist invaginiert und das Chromatin leicht geklumpt. Der Nucleolus ist aufgelockert. Vereinzelt stülpt sich die Kernmembran ein (Abb.57). Die Mitochondrien sind gegenüber den letzten Zeitwerten unverändert, jedoch liegt das rER wieder in kürzeren Abschnitten vor. Fetteinlagerung und Vakuolenbildung nehmen zu. Weiterhin sind hier auch wieder runde, durch Anlagerung von freien Ribosomen abgegrenzte Glykogenbezirke vorhanden (Abb.58).

Nach 72 Stunden

Beim letzten Untersuchungszeitpunkt verstärken sich die Chromatinklumpung, die Kerninvaginationen, die Fetteinlagerung und die Vakuolenbildung gegenüber den vorausgehenden Zeitpunkten. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis ist sehr variabel, da teilweise vergrößerte, daneben aber auch pyknotische Kerne vorliegen (Abb.61). Die Mitochondrien treten - wie beim 48h-Wert - zahlenmäßig unverändert erhöht auf, jedoch lassen sich jetzt die Crista-Strukturen gegen die verdichtete intramitochondriale Matrix abgrenzen (Abb.59). Die Anzahl der Lysosomen hat sich verringert, Strukturen des rER sind kaum vorhanden, nur noch vereinzelt treten kurze Zisternenabschnitte auf. In dem teilweise stark aufgelockerten Zytoplasma sind viele freie Ribosomen vorhanden. Als neuer Zytoplasmabestandteil treten vereinzelt Mikrotubuli auf. Neben verstärkt eingelagerten großen Glykogenbezirken lassen sich auch hier wieder die membranbegrenzten, mit virusähnlichen Partikeln gefüllten Räume erkennen (Abb.60). Die dreizonale Zellgliederung ist nicht mehr vorhanden.

4.4.2.2 Strukturänderung nach Gabe einer 10^{-5} M VDC-Lösung

Nach 0 Stunden

Die Kerne der KB-Zellen sind nach Beendigung der Substanzgabe teilweise rundlich wie bei der unbehandelten Zelle, teilweise aber auch stark pyknotisch. Die Chromatinklumpung und Auflagerung an die Kernmembran ist bei den rundlichen Kernen ähnlich ausgeprägt wie bei der unbehandelten

Zelle, jedoch verstärkt bei den Zellen, die einen geschrumpften pyknotischen Kern aufweisen. Die Mitochondrien sind leicht angeschwollen, aber sonst nicht stark verändert. Neben der geringen Zahl an Lysosomen ist das Fehlen von Strukturen des rER erwähnenswert. Weitere Veränderungen der Zellorganellen sind nicht vorhanden, jedoch liegt eine Tendenz zur zonalen zellulären Dreiteilung (erläutert im Kap. 4.4.2.1) vor.

Nach 3 Stunden

3 Stunden nach Beendigung der Substanzgabe ist im Zellkern eine starke Chromatinklumpung zu erkennen. Das Chromatin ist der Kernmembran nicht mehr gleichmäßig und perlschnurartig, sondern in allen Fällen unregelmäßig und über längere Abschnitte dicht angelagert. Die Kerne der Zellen zeigen starke Invaginationen (Abb.62). Die Nucleoli sind teilweise relativ groß, normal dicht strukturiert und weisen verschwommen begrenzte Pars-amorpha-Bezirke auf.

Im Zytoplasma treten große Lysosomen auf (Abb.62), und auch etwas rER ist vorhanden. Die Mitochondrien sind wie beim Oh-Befund unverändert.

Nach 6 Stunden

6 Stunden nach der Substanzgabe ist die glatte, nicht chromatinbeladene Kernmembran und das transparente, nicht geklumpte Karyoplasma auffällig (Abb.63). Die Nucleoli sind etwas aufgelockert, haben aber immer noch runde Gestalt.

Die Mitochondrien erscheinen weiterhin leicht angeschwollen (Abb.63). Das rER taucht vereinzelt in Form von kurzen, ungeordnet liegenden Zisternen auf. Häufiger treten Fetteinlagerungen und Vakuolenbildung in Erscheinung. Die dreizonale Zellgliederung prägt sich bei diesem Zeitwert weiter aus.

Nach 9 Stunden

Im Vordergrund steht das unterschiedliche Aussehen der Zellkerne: Bei einem Teil der Zellen sind weiterhin keine bzw. nur geringfügige Chromatinauflagerungen zu verzeichnen. Der andere Teil der Zellen weist eine starke Auflagerung und Klumpung des Chromatins auf. Die Nucleoli sind aufgelockert, die Partes amorphae sind zumeist deutlich und klar abgegrenzt zu erkennen (Abb.64). Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis ist manchmal zugunsten des Kernes verschoben.

Die zonale Gliederung in drei Zellareale kristallisiert sich 9 Stunden nach Beendigung der Behandlung deutlich heraus. Der Mikrovillibesatz wird geringer, die Zahl der Zellkontakte zwischen den einzelnen Zellen nimmt ab. Die Mitochondrien imponieren weiterhin verquollen und liegen vermehrt vor. Die Cristae mitochondriales sind zumeist nicht zu erkennen. Die Anzahl der Lysosomen ist geringfügig höher als bei den unbehandelten KB-Zellen. Das rER tritt in ungefähr gleicher Häufigkeit wie bei den Kontrollzellen auf; die Zisternen scheinen teilweise erweitert zu sein.

Neben diesen auch in der Normalstruktur auftretenden Zellorganellen entwickeln sich jetzt auch andere Strukturen: Zum einen ist auf das Erscheinen von Mikrotubuli hinzuweisen; es liegen meistens drei bis vier Tubuli linear oder bogenförmig parallel nebeneinander. Oft scheint das Zytoplasma im Bereich der Mikrotubuli einzureißen, wodurch große Hohlräume entstehen. Die Mikrotubuli werden dabei voneinander getrennt (Abb.65,66). Zum anderen lassen sich auch hier die schon früher beschriebenen membranumgrenzten Räume nachweisen, in denen vereinzelt virusähnliche Partikel vorliegen (Abb.66).

Nach 12 Stunden

12 Stunden nach Beendigung der VDC-Gabe (10^{-5} M) sind Zellen vorhanden, die relativ groß sind und einen großen

Kern haben, welcher in der Mitte eine starke bilaterale oder zirkuläre Einschnürung aufweist. Da keine Serienschritte vorliegen, ist nicht abzuklären, ob es sich hierbei um eine starke Invagination handelt oder ob eine Kernteilung nur unvollständig erfolgt ist. Neben den Invaginationen liegen noch weitere kleinere Kernabschnitte vor, die durch eine durchgehende Kernmembran vollständig gegenüber anderen Kernabschnitten sowie gegenüber dem Zytoplasma abgegrenzt sind. Ob es sich hierbei um angeschnittene Kernausstülpungen oder um völlig abgetrennte kleine Kernabschnitte und damit um eine mehrere Kerne enthaltende Zelle handelt, muß dahingestellt bleiben (Abb.68).

Fetteinlagerung und Vakuolenbildung sind deutlich sichtbar und vermehrt gegenüber den Kontrollzellen, die Mikrovilli an der Zelloberfläche nehmen weiterhin ab. Bei den zytoplasmatischen Zellorganellen treten gegenüber dem 9h-Zeitwert keine Veränderungen auf.

Nach 24 Stunden

Einen Tag nach Beendigung der VDC-Exposition (10^{-5} M) liegen Zellen mit stark gelappten, oft vergrößerten Kernen vor. Der Nucleolus repräsentiert sich als ein aufgelockertes Netzwerk mit aufgehellten Bezirken. Teilweise sind die Pars-amorpha-Bezirke gut zu erkennen. Chromatinklumpungen und -auflagerungen sind kaum noch vorhanden. Die Strukturen des rER sind zahlenmäßig in ähnlicher Größenordnung vorhanden wie bei den unbehandelten Zellen, jedoch mit verlängerten Abschnitten. Die Mitochondrienanzahl wie auch die Fetteinlagerung und Vakuolenbildung sind vermehrt. Abschließend ist noch auf die bandförmige Anordnung der Zellorganellen um den Kern herum hinzuweisen.

Nach 48 - 72 Stunden

2 und 3 Tage nach Substanzgabe ist die veränderte Kern-Zytoplasma-Relation auffällig. In vielen Zellen nimmt der Kern mindestens zwei Drittel der Zelle ein. Die Kernstruktur an sich unterscheidet sich nicht vom Kernbefund nach

24 Stunden. Oft ist allerdings nur ein unregelmäßig geformter Nucleolus sichtbar. Weiterhin sind auch nach 48 Stunden die starken Kerninvaginationen vorhanden.

Das Strukturbild des Zytoplasmas in der Übersichtsvergrößerung wird unruhiger. Die Mitochondrien sind zahlenmäßig vermehrt und gequollen, ihre Form weist viele Variationen auf (Abb.67). Das rER tritt häufiger auf, die einzelnen Zisternenabschnitte sind mittellang und die Zisternen manchmal vergrößert. Größere Fetttropfen lagern sich ins Zytoplasma ein.

4.4.2.3 Strukturveränderung nach Gabe einer 5×10^{-5} M TDC-Lösung

Nach 0 Stunden

Sofort nach Beendigung der Substanzgabe sind im Zytoplasma kaum Veränderungen festzustellen. Lediglich die Mitochondrien haben an Größe etwas zugenommen, das rER scheint sich etwas verringert zu haben. Auffälliger dagegen ist die Kernmembran, die zwar keine tiefen Invaginationen aufweist, jedoch stärker gewellt ist als die unbehandelten KB-Zellen. Neben dem leicht aufgelockerten Nucleolus mit unterschiedlich ausgeprägter Pars-amorpha-Struktur sind die relativ starke Chromatinklumpung und die dichten Ablagerungen des Chromatins auf der Kernmembran zu erwähnen.

Nach 3 - 6 Stunden

Die Kernmembran ist auch in diesen Zeitabschnitten leicht gewellt, jedoch scheint die Chromatinklumpung abzunehmen. Die Nucleoli sind aufgelockert, die Pars-amorpha-Bezirke nicht klar zu differenzieren.

Im Zytoplasma ist die Anzahl der Mitochondrien leicht ansteigend, auch treten bezüglich der Mitochondrienform stärkere Variationen auf. Das rER ist weiterhin nur in geringem Ausmaß vorhanden. Bei einem Teil der Zellen ist

auffällig, daß sich das Kern-Zytoplasma-Verhältnis zugunsten des Kernes verschiebt.

Nach 9 - 12 Stunden

Auch bei diesen Untersuchungszeitpunkten sind Kerninvasionen auffällig. Der Nucleolus verliert seine runde Form, er ist mit hellen Bezirken durchsetzt. Im Zytoplasma sind die Mitochondrien geschwollen und haben sich zahlenmäßig vermehrt. Lysosomen sind kaum vorhanden, das rER ist gering ausgeprägt. Verstärkt haben sich die Fetteinlagerungen und Vakuolenbildungen. Besonders auffällig ist nach 12 Stunden die Ausbildung von Mikrotubuli: Zu beobachten sind zwei bis vier parallel zueinander verlaufende Strukturen, die oft Kontakt zu in ihrer Nähe liegenden Hohlräumen haben. Bei diesen Hohlräumen handelt es sich um unregelmäßig begrenzte, ausgefrante Strukturen, welche teilweise die Mikrotubuli in ihrem durchgehenden Verlauf unterbrechen. Daneben sind auch die schon beschriebenen, scharf abgegrenzten, membranumgebenen Räume mit virusähnlichen Partikeln zu erkennen. Bei einigen Zellen scheint der Zellkontakt untereinander nicht mehr so innig zu sein, da nebeneinanderliegende Zellen über weite Flächen keinen Kontakt mehr aufweisen.

Nach 24 Stunden

Die Kernmembran der KB-Zellen ist auch weiterhin gewellt, die Chromatinklumpungen scheinen abzunehmen. Es ist auffällig, daß sich in jedem Kern mehrere - bis zu sieben - unterschiedlich große Nucleoli befinden. Das Zytoplasma weist in bandförmiger Anordnung um den Kern geschwollene Mitochondrien, kurze und wenige Zisternen des rER, eine erhöhte Anzahl von Lysosomen und die schon mehrmals erwähnten membranbegrenzten Räume mit virusähnlichen Partikeln auf. Auch Mikrotubuli sind 1 Tag nach Substanzgabe zu beobachten.

Nach 48 Stunden

2 Tage nach Beendigung der Substanzexposition ist

schon bei niedriger Vergrößerung das relativ unruhige Bild des Zytoplasmas auffällig: Das sonst unauffällige rER hat sich erheblich vermehrt und liegt in kurzen, wurmförmigen Abschnitten vor (Abb.69). Die Anzahl der Mitochondrien ist gegenüber den unbehandelten Zellen wesentlich angestiegen. Die Mitochondrien sind stark geschwollen und variieren deutlich in Form und Größe voneinander. Das Zytoplasma einiger Zellen ist aufgelockert, und kleine Glykogenbezirke ohne dichte ribosomale Abgrenzung treten auf. Die Zellkontakte sind jetzt lockerer, die Mikrovilli an der Zelloberfläche haben sich verringert. Auch hier finden sich membranbegrenzte Hohlräume mit virusähnlichen Partikeln. Das Karyoplasma weist kaum Chromatinklumpungen auf, die innere Kernmembran ist nicht mit Heterochromatin belegt. Der Kern erscheint deswegen transparenter als das Zytoplasma. Abschließend ist darauf hinzuweisen, daß sich bei mehreren Zellen dieses Untersuchungszeitpunktes das Kern-Zytoplasma-Verhältnis deutlich zugunsten des Kerns verschiebt.

Nach 72 Stunden

Die fortschreitende Degeneration der KB-Zellen steht im Vordergrund. Sie ist gekennzeichnet durch starke Kerninvaginationen, Chromatinklumpungen und große Glykogen- und Fettbezirke im Zytoplasma. Außer den geschwollenen Mitochondrien sind auch zahlreich auftretende, parallel verlaufende Zisternen des rER auffällig (Abb.70). Vereinzelt sind neben den nekrotisch werdenden KB-Zellen noch Zellen zu finden, deren Degeneration noch nicht so fortgeschritten ist. Meistens handelt es sich hierbei um einkernige Riesenzellen, bei denen der Kern fast das gesamte Zellvolumen einnimmt. Erwähnenswert ist dabei, daß der Kern dieser Zellen keinerlei Chromatinklumpung aufweist und daß der Nucleolus nur geringfügig aufgelockert ist.

4.4.2.4 Strukturveränderung nach Gabe einer 5×10^{-4} M TDC-Lösung

Einleitend muß bei Betrachtung dieser Untersuchungsreihe darauf aufmerksam gemacht werden, daß die elektronenmikroskopischen Befunde den morphologischen Veränderungen nach Gabe einer niedermolaren TDC-Lösung (5×10^{-5} M) gleichen. Der Zeitpunkt ihres Auftretens differiert jedoch.

Nach 0 Stunden

Sofort nach Beendigung der Substanzexposition lassen sich auffällige Strukturveränderungen beobachten. Im Zytoplasma sind geschwollene und erheblich in ihrer Form variierende Mitochondrien sichtbar. Die Cristae mitochondriales sind kaum zu erkennen. Strukturen des rER sind kaum vorhanden, jedoch finden sich schon bei diesem frühen Untersuchungszeitpunkt kleine Bezirke mit Glykogeneinlagerungen. Neben relativ zahlreich vorhandenen Lysosomen sind keinerlei andere zytoplasmatische Veränderungen auffällig. Zu bemerken sind jedoch die stark ausgeprägten Kerninvaginationen und die im Vergleich zur unbehandelten Zelle relativ starke Chromatinklumpung. Die Kernkörperchen sind stark aufgelockert und die Pars-amorpha-Bezirke verschwommen.

Nach 3 - 12 Stunden

Bei den nächsten Untersuchungszeitpunkten treten die Veränderungen ein, die bei der niedrigen Konzentration erst zwischen 24 und 48 Stunden zu beobachten sind. Die Mitochondrien haben sich vermehrt und sind angeschwollen. Das bis zum 9h-Wert unauffällige rER wird nun deutlich sichtbar und tritt leicht vermehrt mit kurzen Zisternen auf. Nach 6 Stunden treten Mikrotubuli auf, die parallel zueinander verlaufen. Die Anzahl der Lysosomen hat sich erhöht, hin und wieder sind kleine Fetttropfen vorhanden.

Stärkere Veränderungen sind am Kern zu sehen: Die Chromatinklumpungen und Chromatinauflagerungen an der Kernmem-

bran nehmen zunächst - 3 bis 6 Stunden nach Expositions-ende - wieder ab, steigen jedoch späterhin erneut leicht an. Nach 12 Stunden ist das Karyoplasma ähnlich dem der unbehandelten Zelle gestaltet. Unterschiedlich ist jedoch das Kern-Zytoplasma-Verhältnis, da es sich bei auffallend vielen Zellen zugunsten des Kernes verschoben hat. Im weiteren sind Zellen zu beobachten, bei deren Zellkernen es sich entweder um stark invaginierte Kerne handelt oder bei denen die Kernteilung nicht vollständig erfolgt ist. Im letzten Fall könnte es sich demnach um zweikernige Riesenzellen in Ausbildung handeln (Abb.71,72).

Nach 24 Stunden

Einen Tag nach Beendigung der Substanzgabe ist ein großer Teil der Zellen schon stark degenerativ verändert. Die Kerne sind erheblich invaginiert, weisen ausgeprägte Chromatinklumpungen und stark aufgelockerte Nucleoli auf. Auch das Zytoplasma dieser Zellen ist deutlich degeneriert, da viele und große Fetttropfen neben vielen kleineren Vakuolen das Bild bestimmen.

Die Mitochondrien sind auch beim 24h-Wert zahlreich vorhanden, nur selten ist die Struktur der Cristae mitochondrialis zu erkennen. Daneben treten auch hier die membranbegrenzten Räume auf, die virusähnliche Partikel beinhalten. Die Anzahl der Mikrovilli hat sich verringert, die Zellkontakte sind aufgelockert.

Nach 48 - 72 Stunden

Die Degeneration der Zellen ist bei den nächsten Untersuchungszeitpunkten stark fortschreitend. Die teilweise stark eingestülpten Kernmembranen weisen zunehmend dicke Chromatinauflagerungen auf. Angelagert an den aufgelockerten Nucleolus sind meistens mehrere dichte Chromatinhaufen im Kern zu finden. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis ist recht unterschiedlich. Neben den Zellen mit pyknotischen Kernen sind auch Zellen zu finden, deren Kernvolumen fast das gesamte Zellvolumen einnimmt. Weiterhin sind neben

zweikernigen Riesenzellen auch Zellen zu beobachten, bei denen die Kernsegmente nur noch über dünne karyoplasmatische Brücken miteinander verbunden sind.

Das Zytoplasma ist dem des 24h-Befundes sehr ähnlich, wobei jedoch die Einlagerungen und Veränderungen an den Zellorganellen einen stärkeren Ausprägungsgrad aufweisen. Das bei der niedrigkonzentrierten TDC-Lösung stärker hervortretende, parallel verlaufende rER ist auch bei der höheren Konzentration gut ausgeprägt. Oft sind die jetzt längeren Zisternen des rER parallel zur Kernmembran angeordnet. Mikrotubuli sind bei diesem Untersuchungszeitpunkt ebenfalls sichtbar. Die vorhandenen Glykogeneinlagerungen sind nicht rundlich und ribosomal abgegrenzt, sondern weisen völlig ungeordnete Ausdehnungen auf (Abb.73). Die Zellkontakte sind teilweise sehr locker, so daß die schon beschriebene "Aufknäuelung der Zellmembran" auch hier wieder auftritt.

4.4.2.5 Strukturveränderung nach Gabe einer 5×10^{-7} M DDP-Lösung

Nach 0 - 9 Stunden

Schon in den ersten Stunden nach Beendigung der Substanzexposition treten die Veränderungen des rER deutlich in den Vordergrund: Das bei der unbehandelten Zelle unscheinbare rER ist kurz nach Ende der DDP-Exposition gehäuft vorhanden, jedoch handelt es sich dabei ausschließlich um kurze ribosomenbesetzte Zisternen. Die Mitochondrien vermehren sich deutlich während des Untersuchungszeitraumes von 0 bis 9 Stunden und verändern ihre Form: Die sonst runden bis ovalen Mitochondrien nehmen eine längliche, nieren- oder hufeisenförmige Gestalt an. Die Cristae mitochondriales sind zumeist nicht zu erkennen.

Die Kernmembran ist teilweise vergrößert, vereinzelt ist auch das Kern-Zytoplasma-Verhältnis leicht zugunsten des

Kernes verschoben. Die Chromatinauflagerungen sind ähnlich denen der unbehandelten Zellen, auch sind die Chromatinklumpungen innerhalb des Karyoplasmas nicht auffällig. Bemerkenswert ist aber, daß vereinzelt große Fetttropfen vorhanden sind.

Nach 12 Stunden

Einen halben Tag nach Beendigung der DDP-Gabe (5×10^{-7} M) ist die Lockerung der Zellkontakte auffällig. Die "Aufknäuelung der Zellmembran" ist auch weiterhin zu beobachten (Abb.74).

Im Zytoplasma sind Veränderungen an den Mitochondrien und am rER nicht so deutlich ausgeprägt. Die Zisternen des rER werden etwas länger, wobei die Anzahl gegenüber den Anfangswerten (0-9h) nicht anzusteigen scheint. Die Mitochondrien sind gequollen und treten häufiger auf. Die Fetteinlagerungen sind voluminöser, teilweise ist auch das Zytoplasma mit vereinzelt Vakuolen durchsetzt. Auffällig ist das Auftreten von wiederum parallel zueinander angeordneten Mikrotubuli zu diesem Zeitpunkt (Abb.74).

Die Kernstruktur ist unterschiedlich ausgebildet: Teilweise sind in einer Zelle zwei bis drei Nucleoli mit geordneter Pars-amorpha-Struktur zu finden. Daneben sind aber auch Kerne mit aufgelockertem Nucleolus und unterschiedlich starker Chromatinklumpung vorhanden. Abschließend sollen noch die intranucleären Doppelmembransysteme erwähnt werden, die auch nach VDC-Behandlung auftreten (Abb.75).

Nach 24 Stunden

Einen Tag nach DDP-Gabe sind teilweise schon stark degenerierte Zellen zu beobachten. Die Kerne weisen dabei eine stark gelapte Form auf. Das Kernvolumen ist im allgemeinen sehr variabel: Neben erheblich geschrumpften Nuclei sind auch Kerne zu beobachten, die fast das gesamte Zellvolumen einnehmen. Die Chromatinklumpungen sind stets vor-

handen, bei einigen Zellen in stärkerem Maße. Die normalen Nucleolus-Strukturen sind aufgehoben, es sind nun nur noch verschwommene Pars-amorpha-Bezirke zu erkennen. Das Zytoplasma ist mit vielen Vakuolen durchsetzt und erscheint daher stark aufgelockert. Daneben sind große Fetttropfen auffällig. Zahlreiche Lysosomen und Mitochondrien, die stark in ihrer Form variieren, sind neben den ungeordneten Glykogeneinlagerungen zu erwähnen. Strukturen des rER sind nicht sichtbar.

Nach 48 - 72 Stunden

Die schon nach 1 Tag beobachtete Zelldegeneration ist stark fortschreitend. Ein Großteil der Zellen besitzt kein geordnetes Zytoplasma mehr. Die Zelle besteht hauptsächlich aus intrazytoplasmatischen Leerräumen, Fett- und Glykogeneinlagerungen. Die Kerne sind unterschiedlich groß und haben entweder keine Chromatinklumpung oder nur mäßige Chromatinauflagerungen. Daneben sind aber vereinzelt Zellen zu erkennen, die noch nicht so stark nekrotisch und den beschriebenen Zellen beim 24h-Wert ähnlich sind.

Abschließend soll noch einmal auf das Kern-Zytoplasma-Verhältnis eingegangen werden. Neben den Zellen mit pyknotischen Kernen sind teilweise zwei- bzw. dreikernige Riesenzellen zu erwähnen (Abb.76,77). Die Anzahl der Mikrovilli auf der Zelloberfläche hat sich stark verringert, gelegentlich sind auch gar keine mehr zu sehen.

4.4.2.6 Strukturveränderung nach Gabe einer 5×10^{-6} M DDP-Lösung

Im Gesamteindruck gleichen die Veränderungen an den KB-Zellen nach Gabe einer 5×10^{-6} M DDP-Lösung denen, die nach Gabe einer 5×10^{-7} M DDP-Lösung eintreten, wobei sich Intensität und Zeiten des Auftretens etwas unterscheiden. Außerdem ist auffällig, daß bei früheren Zeitwerten immer ein Teil der Zellen schon stark geschädigt ist und der andere Teil nur leichtere morphologische

Strukturveränderungen aufweist.

Nach 0 Stunden

Sofort nach Beendigung der DDP-Gabe sind außer der stärker gewellten Kernmembran keine Veränderungen im Kern sichtbar. Dagegen ist aber die Zytoplasmastruktur unruhiger geworden: Neben großen Lysosomen sind leicht angeschwollene Mitochondrien zu beobachten. Das rER ist auch hier nur unscheinbar in Form von kurzen Zisternenabschnitten vorhanden. Auffällig ist das intrazytoplasmatische Auftreten von Mikrotubuli bereits zu diesem frühen Zeitpunkt.

Nach 3 - 12 Stunden

Ein Teil der Zellen ist zunehmend degenerativ geschädigt. Das Zytoplasma ist dabei mit Vakuolen und Fetteinlagerungen durchsetzt, die Zellkontakte sind gelockert. Der zahlenmäßige Anteil dieser Zellen nimmt abhängig vom Untersuchungszeitpunkt zu.

Neben diesen nekrotisch werdenden Zellen sind Zellen vorhanden, bei denen die morphologischen Schäden noch nicht so stark ausgeprägt sind. Bei allen diesen Zellen ist eine starke Kernlappung festzustellen; diese Kernlappung geht so weit in die Tiefe des Kernes, daß gelegentlich inmitten des Schnittbildes von Kernen vollständig abgegrenzte Zytoplasmabezirke sichtbar werden. Die geschwollenen Mitochondrien werden zahlreicher, wobei sich auch bei späteren Untersuchungszeitpunkten eine Crista-Struktur erkennen läßt. Das rER wird auffälliger, es besteht zwar immer noch aus verhältnismäßig kurzen Elementen, bei denen die Zisternen jedoch verbreitert erscheinen. Auch bei diesen Untersuchungszeitpunkten sind wieder Mikrotubulussysteme vorhanden.

Nach 12 Stunden treten erstmalig zweikernige Riesenzellen auf. Im Kern ist die Nucleolusstruktur teilweise aufgelockert und die Partes amorphae sind aufgehoben. Die

Chromatinklumpung ist nicht stark, die Auflagerungen auf der Kernmembran ähneln denen der unbehandelten Zelle.

Nach 24 Stunden

Auch einen Tag nach der Substanzgabe sind unterschiedlich veränderte Zellen zu beschreiben. Zum einen sind Zellen mit großflächigen Leerräumen und Fetteinlagerungen im Zytoplasma zu beobachten, wobei der Kern gelappt und das Chromatin leicht geklumpt ist. Der Nucleolus hat dabei verdichtetes Aussehen und weist mehrere Pars-amorpha-Bezirke auf. Zum anderen sind Zellen vorhanden, die zwei spiegelbildlich aneinandergelagerte Kerne aufweisen. Diese Kerne haben jeweils einen dichten, dunkel erscheinenden Nucleolus und ein bis zwei kappenartige Chromatinhaufen, die Kontakt zur Kernmembran haben. Im Zytoplasma dieser Zellen sind die Zellorganellen bandförmig um den Kern angeordnet, wobei langgestreckte membranabgeschlossene Räume auffallen (Abb.78). Mikrovilli sind kaum noch an der Zelloberfläche zu sehen.

Nach 48 - 72 Stunden

Wie auch schon 1 Tag nach der Behandlung ist nach 2 bzw. 3 Tagen die Zelldegeneration stark fortgeschritten, und ein großer Teil der Zellen zeigt nekrotisches Aussehen.

Das Zytoplasma ist auch jetzt mit großen Leerräumen und aneinandergelagerten Fetttropfen durchsetzt. Die Kerne sind gelappt; teilweise ist das Kern-Zytoplasma-Verhältnis zugunsten des Kernes verschoben. Kappenartige Chromatinauflagerungen sind nicht zu beobachten. Die Nucleoli sind aufgelockert, ohne eine regelrechte Pars-amorpha-Struktur zu beinhalten. Teilweise enthalten die Kerne ähnlich wie bei den unbehandelten Zellen nur geringfügige Heterochromatinklumpungen, teilweise ist gar keine Chromatinanhäufung vorhanden. Die Mitochondrien haben sich verringert, das rER tritt vereinzelt in kurzen Abschnitten auf.

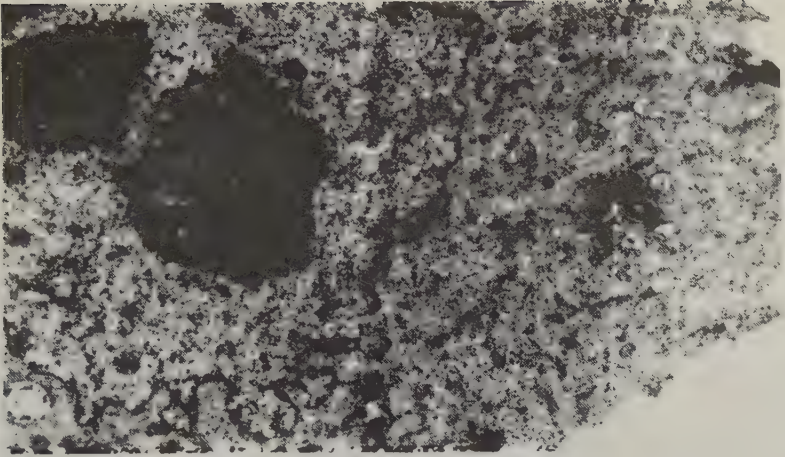


Abb. 47: KB-Zelle 0h nach Beendigung der 10^{-6} M VDC-Gabe
- stark gewellte Kernmembran, verschwommene Struktur der
Pars amorpha des Nucleolus; V = 14300.

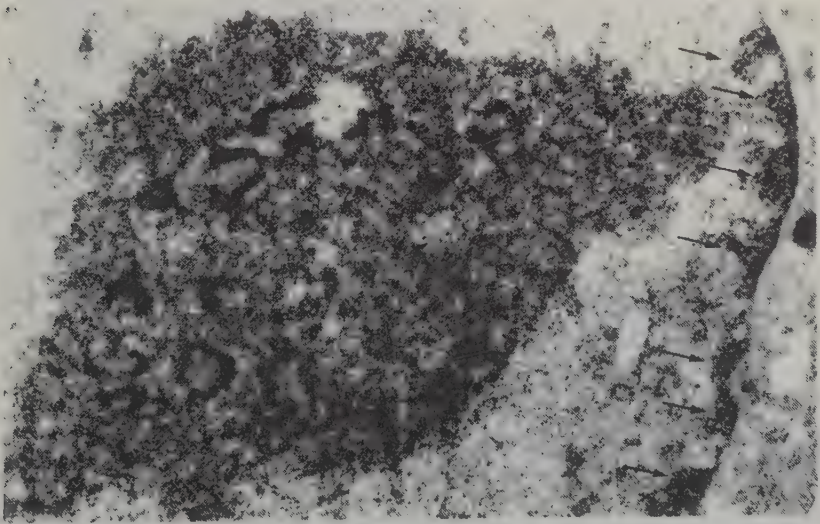


Abb. 48: KB-Zelle 6h nach Beendigung der 10^{-6} M VDC-Gabe
- perlschnurartige Chromatinauflagerungen an der Kernmem-
braninnenseite ($\longrightarrow$), verschwommene, abgegrenzte Pars
amorpha, aufgelockerter Nucleolus (N); V = 33200.

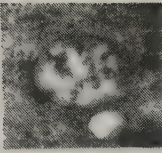


Abb. 49: KB-Zelle 3h nach Beendigung der 10^{-6} M VDC-Gabe - membranabgegrenzter Raum mit virusähnlichen Partikeln; V = 38900.

Abb. 50

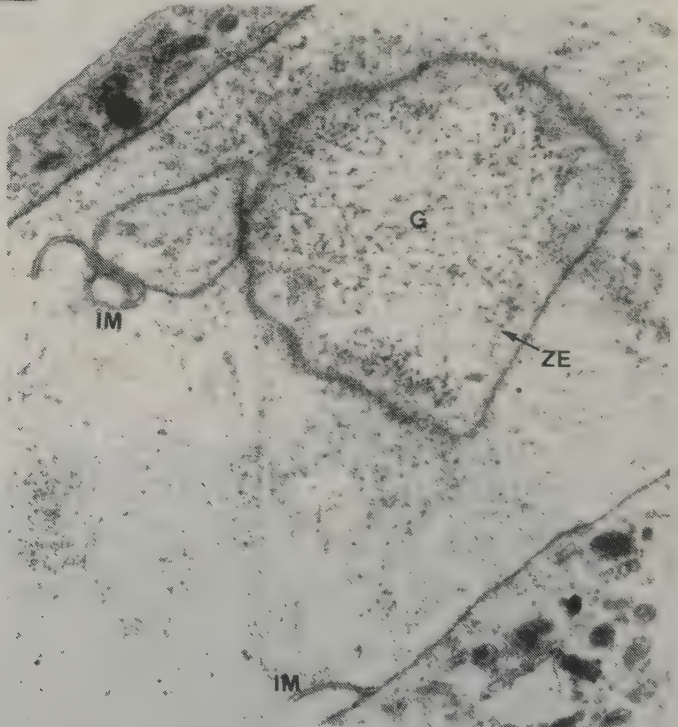


Abb. 50, 51: KB-Zellen 6h nach Beendigung der 10^{-6} M VDC-Gabe - keine Chromatinauflagerungen bzw. -klumpungen, intranucleäre Membranausläufer (IM), zytoplasmatische Einstülpung in den Kern (ZE) mit Glykogen (G) und Membranausläufern; $V_{\text{Abb.50}} = 27700$, $V_{\text{Abb.51}} = 29500$.



Abb. 51

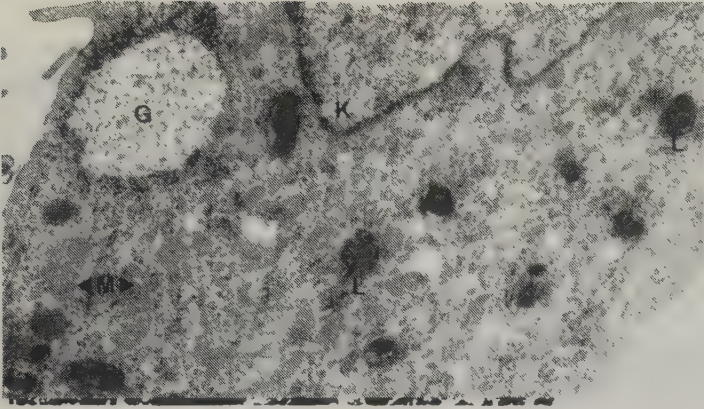


Abb. 52: KB-Zelle 6h nach Beendigung der 10^{-6} M VDC-Gabe - Glykogeneinlagerung mit ribosomaler Abgrenzung (G), Mitochondrium (M), Lysosom (L), Kern (K); $V = 28700$.

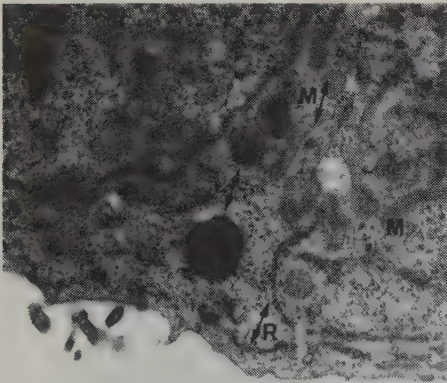


Abb. 53

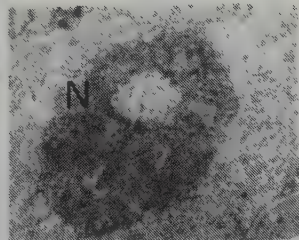


Abb. 54

Abb. 53, 54: KB-Zellen 9h nach Beendigung der 10^{-6} M VDC-Gabe - raues endoplasmatisches Retikulum (R), Mitochondrium (M), Lysosom (L), aufgelockerter Nucleolus mit Karyoplasma (N), keine Chromatinauflagerung; $V_{Abb.53} = 27000$, $V_{Abb.54} = 11400$.

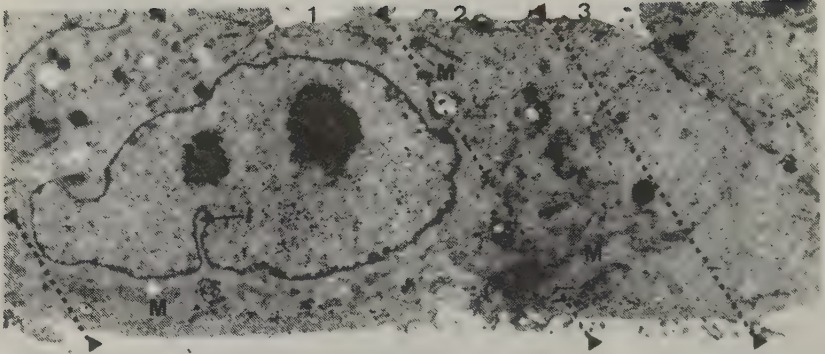


Abb. 55: KB-Zelle 12h nach Beendigung der 10^{-6} M VDC-Gabe
- Phänomen der dreizonalen Gliederung: zentraler Anteil
mit Kern und Kernmembran (1), medialer Anteil mit Zellorga-
nellen (2), peripherer Anteil ohne Zellorganellen (3),
Kerninvagination (I), Mitochondrien (M); V = 9500.

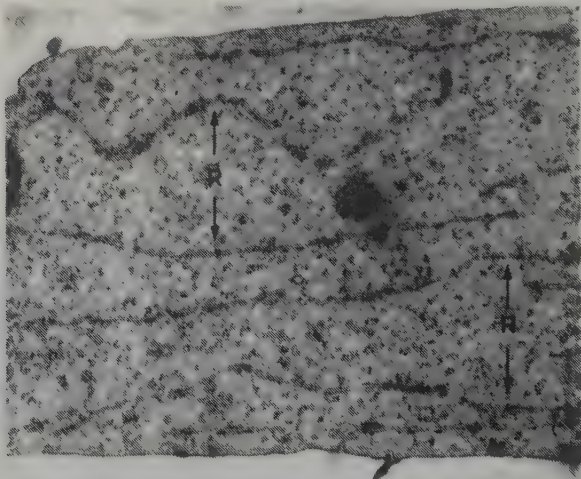


Abb. 56: KB-Zelle 24h nach Beendigung der 10^{-6} M VDC-Gabe
- lange Abschnitte vom endoplasmatischen Retikulum (R),
keine Mikrovilli; V = 39600.

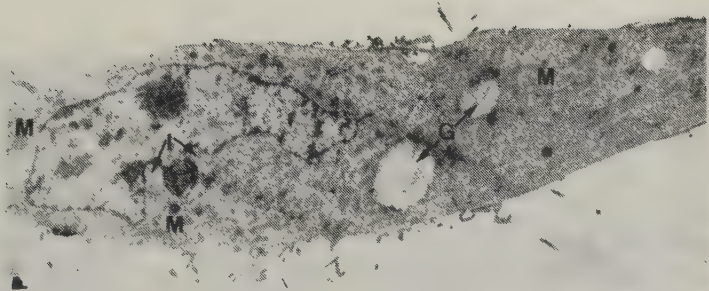


Abb. 57

Abb. 57, 58: KB-Zelle 48h nach Beendigung der 10^{-6} M VDC-Gabe - Kerninvagination (I), Chromatinklumpung, geschwollene Mitochondrien (M), ribosomal. abgegrenzte Glykogeneinlagerungen (G), $V_{\text{Abb.57}} = 8900$, $V_{\text{Abb.58}} = 34200$.

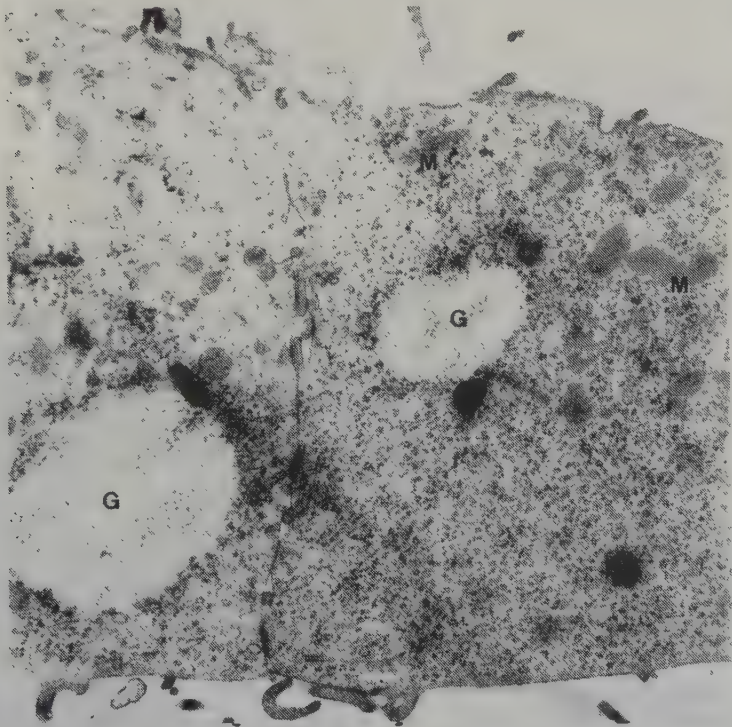


Abb. 58

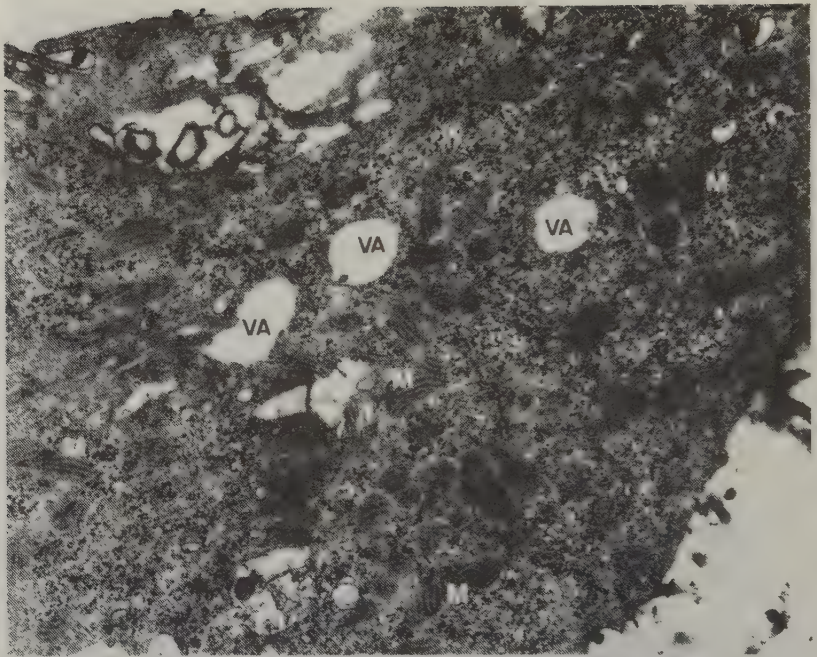


Abb. 59: KB-Zelle 72h nach Beendigung der 10^{-6} M VDC-Gabe
V = 33800, Erläuterung siehe nächste Seite.

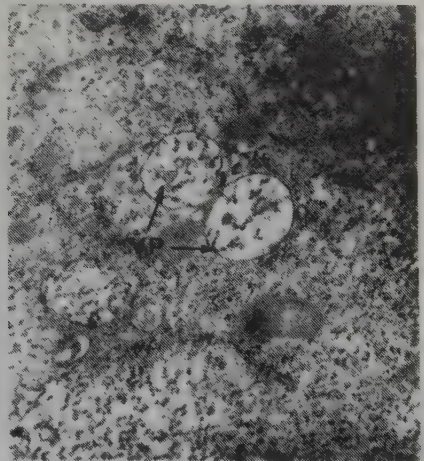


Abb. 60: KB-Zelle 72h
nach Beendigung der 10^{-6} M
VDC-Gabe; V = 39000,
Erläuterung siehe nächste
Seite

Abb. 59, 60, 61: KB-Zellen 72h nach Beendigung der 10^{-6} M VDC-Gabe - invaginierte Kerne mit Chromatinklumpungen, Vakuolen (VA), vermehrte Mitochondrien mit gut ausgeprägter Crista-Struktur und verdichteter intramitochondrialer Matrix (M), membranumgrenzte Räume mit virusähnlichen Partikeln (VP).



Abb. 61: KB-Zelle 72h nach Beendigung der 10^{-6} M VDC-Gabe;
V = 19400.

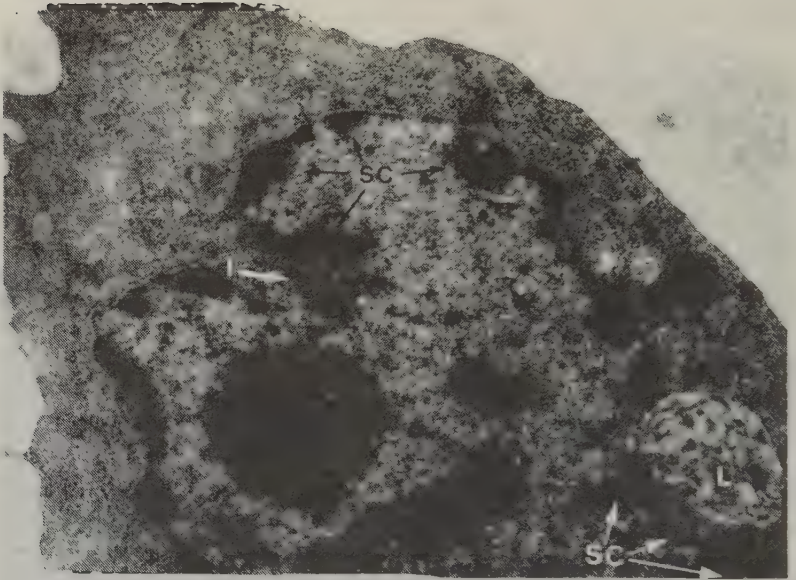


Abb. 62: KB-Zelle 3h. nach Beendigung der 10^{-5} M VDC-Gabe

Abb. 63: KB-Zelle 6h nach Beendigung der 10^{-5} M VDC-Gabe

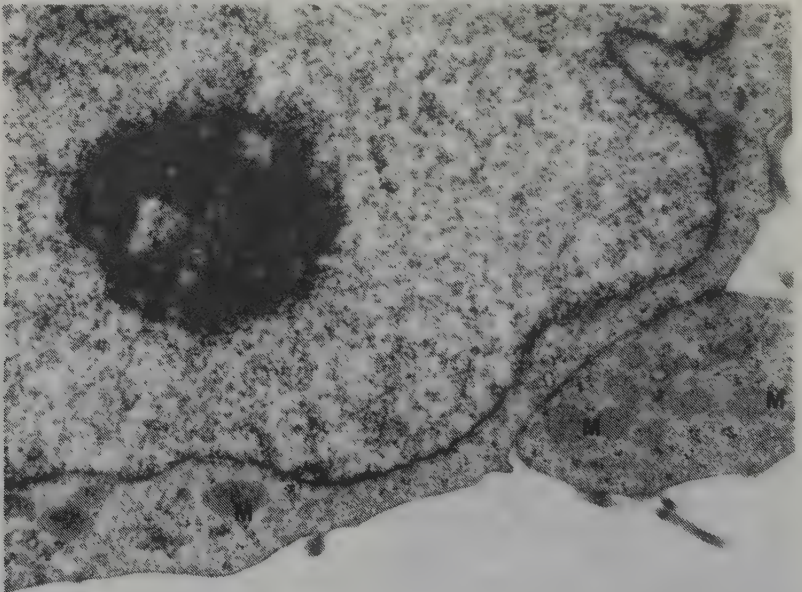


Abb. 62, 63: Kerninvagination (I), starke Chromatinauflagerung 3h nach Behandlung (SC), Kernmembran ohne Chromatinauflagerungen 6h nach Behandlung, großes Lysosom (L), leicht angeschwollene Mitochondrien (M); $V_{Abb.62} = 38300$, $V_{Abb.63} = 38400$.

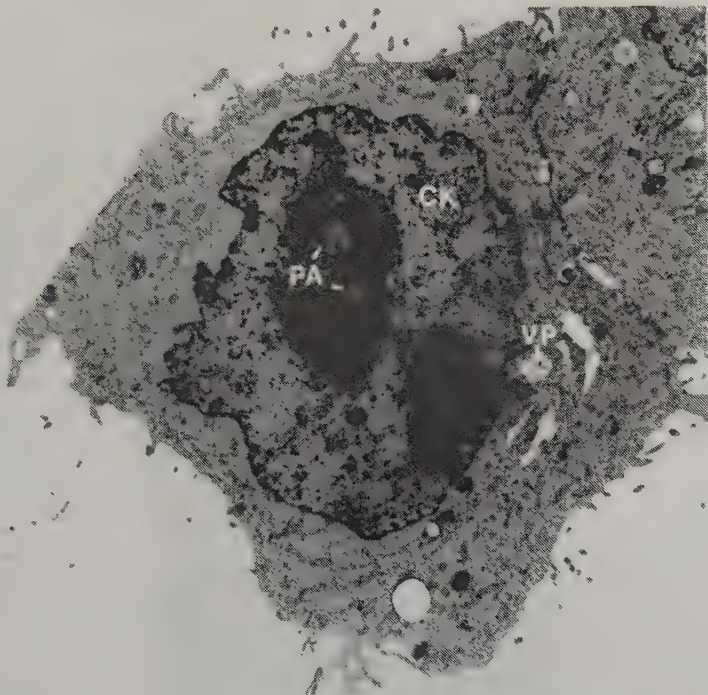
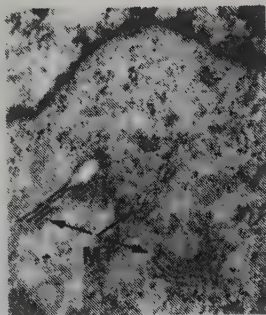


Abb. 64

Abb. 65

Abb. 64 - 66: KB-Zelle 9h nach Beendigung der 10^{-5} M VDC-Gabe - Chromatinklumpung (CK), Nucleoli mit Partes amorphae (PA), wenige Mikrovilli an der Zelloberfläche, Mikrotubuli im Zytoplasma (MT), membranumgrenzter Raum mit virusähnlichen Partikeln (VP); Lysosomen (L); $V_{Abb. 64} = 9400$, $V_{Abb. 65} = 36800$.



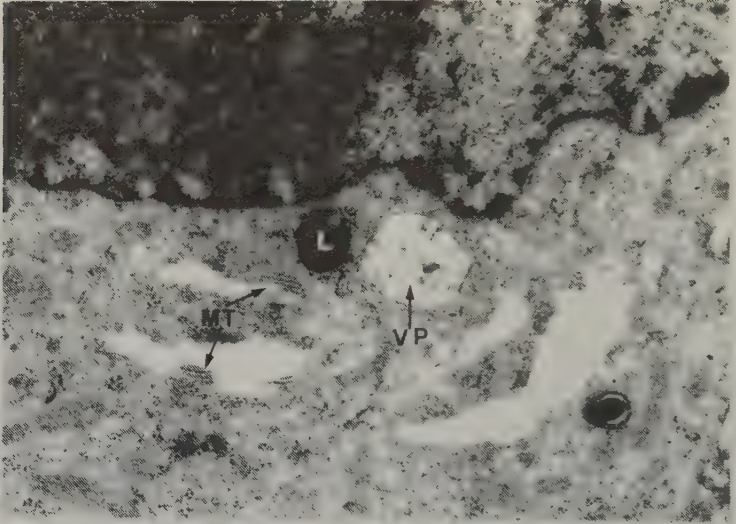


Abb. 66: KB-Zelle 9h nach Beendigung der 10^{-5} M VDC-Gabe
Erläuterung auf der vorhergehenden Seite, V = 35400.

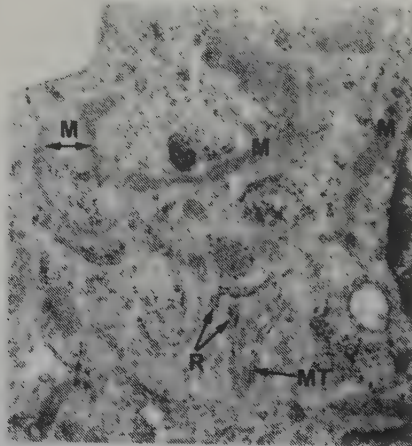


Abb. 67: KB-Zelle 48h nach Beendigung der 10^{-5} M VDC-Gabe
- stark veränderte Mitochondrien (M), raues endoplasma-
tisches Retikulum mit erweiterten Zisternen (R), Lyso-
somen (L), Mikrotubuli (MT); V = 31600.



Abb. 68: KB-Zellen 12h nach Beendigung der 10^{-5} M VDC-Gabe
- geringe Chromatinklumpung, bilaterale Kerninvagination
(I), abgeschnürte Kernabschnitte (K), Raum mit virusähn-
lichen Partikeln (VP), verformtes Mitochondrium (M),
Vakuolen (V); V = 9500.

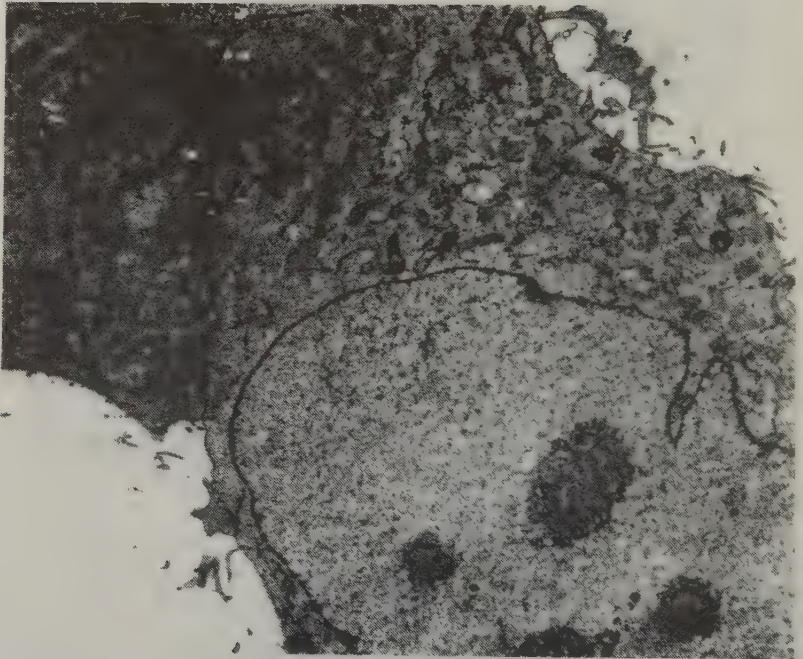


Abb. 69: KB-Zellen 48h nach Beendigung der 5×10^{-5} M TDC-Gabe - kurze wurmförmige Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (R), Kerninvagination, keine Chromatinklumpung-transparenter Kern; V = 9700.

Abb. 70: KB-Zelle 72h nach Beendigung der 5×10^{-5} M TDC-Gabe, viele lange parallelverlaufende Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums; V = 15800.

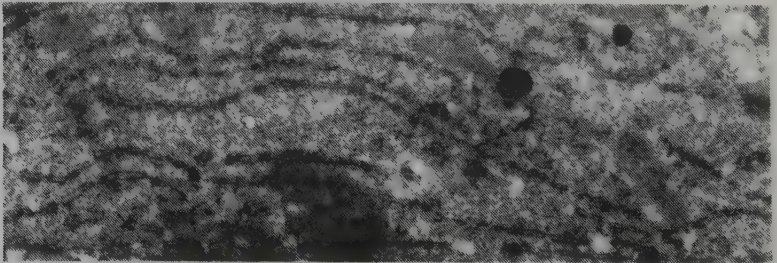


Abb. 71: KB-Zellen 6h nach
Beendigung der 5×10^{-4} M
TDC-Gabe, zweikernige Rie-
senzelle, einkernige Rie-
senzelle mit intranucleärem
Membranausläufer (IM) und
prominentem Nucleolus;
V = 9500.



Erläuterung zu den Foto-
graphien der folgenden
Seite:

Abb. 72: KB-Zelle 9h nach Beendigung der 5×10^{-4} M TDC-
Gabe - Riesenzelle mit zwei Kernen, die über eine dünne
Karyoplasmabrücke verbunden sind; V = 14000.

Abb. 73: KB-Zellen 72h nach Beendigung der 5×10^{-4} M TDC-
Gabe - stark geschädigte Zelle, Fetttropfen, Glykogen (G),
lange Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums,
Vakuolen; V = 14400.

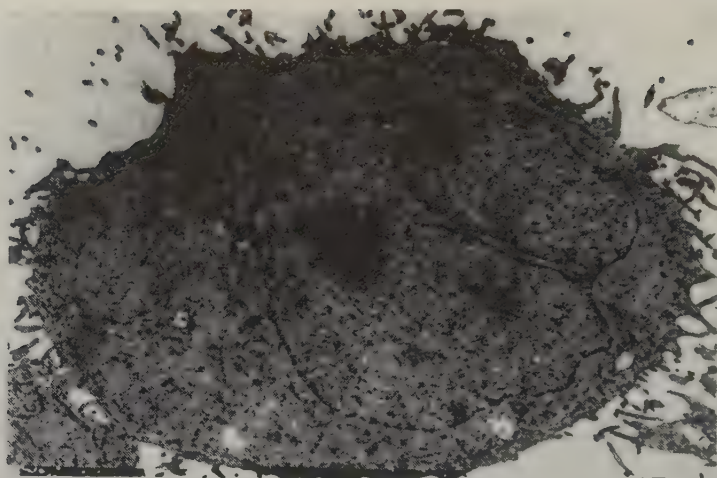


Abb. 72 Erläuterung vorhergehende Seite

Abb. 73

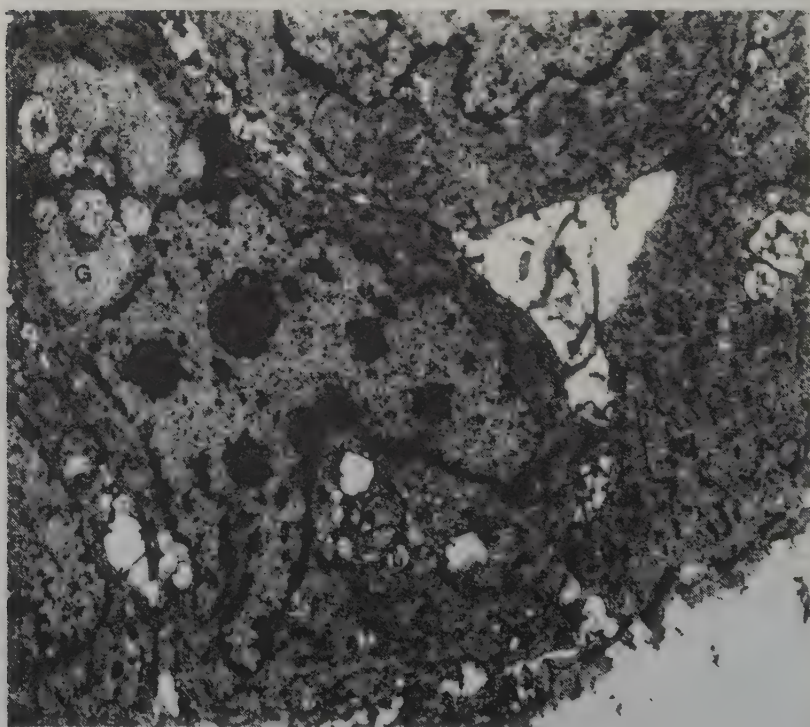


Abb. 74

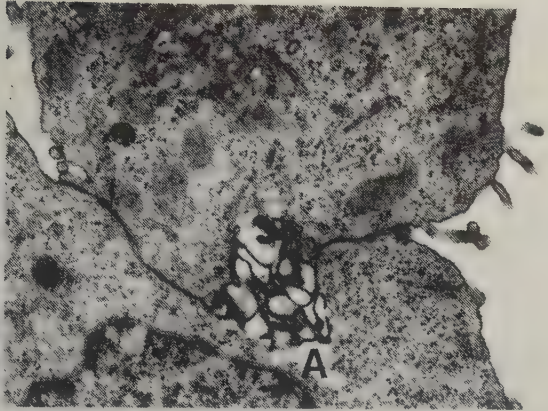


Abb. 75

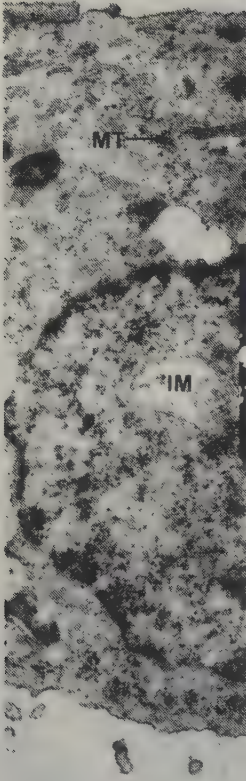


Abb. 74, 75: KB-Zelle 12h nach Beendigung der 5×10^{-7} M DDP-Gabe - Aufknäuelung der Zellmembran (A), Mikrotubuli (MT), intranucleäre Membran (IM);

$V_{\text{Abb. 74}} = 38200$, $V_{\text{Abb. 75}} = 38000$.

Abb. 76: KB-Zelle
48h nach Beendigung der 5×10^{-7} M
DDP-Gabe -
zweikernige Riesenzelle;
 $V = 14200$.



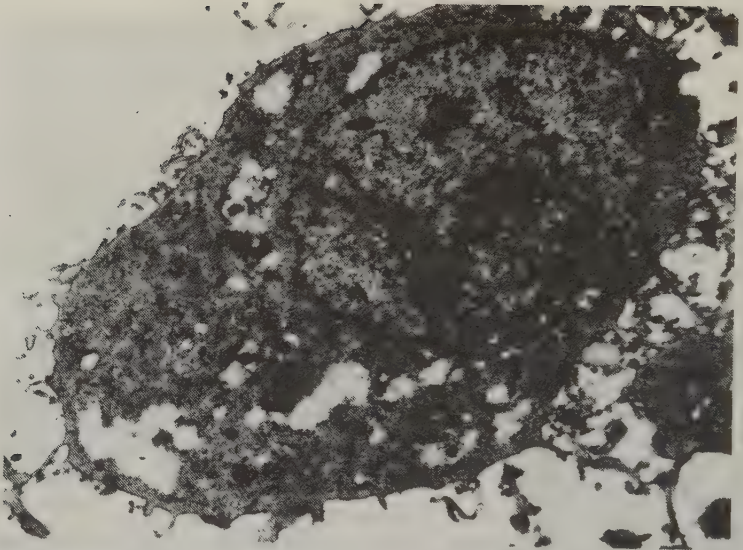
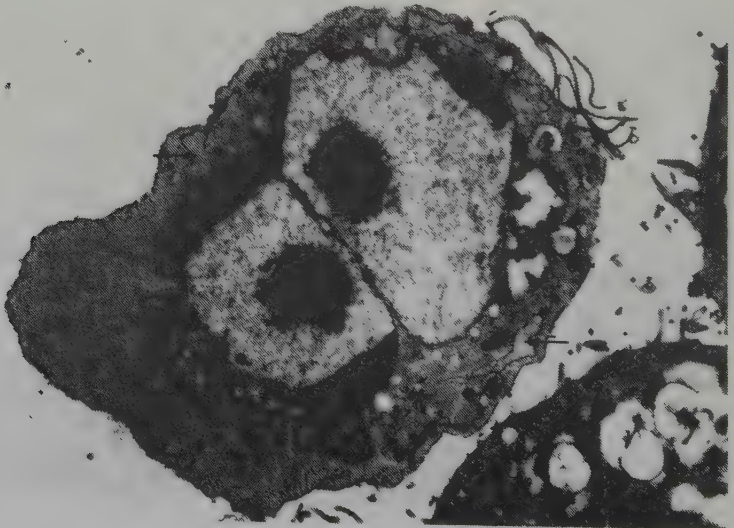


Abb. 77: KB-Zelle 48h nach Beendigung der 5×10^{-7} M DDP-Gabe - stark geschädigte Zelle, Kerninvagination, Leerräume, intrazytoplasmatische Fetteinlagerung; V = 11500.

Abb. 78: KB-Zelle 24h nach Beendigung der 5×10^{-6} M DDP-Gabe - Zelle mit kappenartiger Chromatinklumpung und degenerierten Organellen (—>); V = 13300.



5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals an einer humanen, standardisierten Tumorzelllinie sowohl das Wachstumsverhalten als auch die morphologischen Veränderungen nach Gabe der Metalloccen-dihalogenide VDC und TDC in vitro untersucht. Untersuchungen von Metalloccen-dihalogeniden mit ähnlicher Fragestellung wurden bisher von KÖPF-MAIER¹⁹⁻³³ sowohl in vitro als auch in vivo an Ehrlich-Aszites-Tumorzellen durchgeführt. Dabei wurde die anorganische Verbindung DDP, die seit wenigen Jahren in der Klinik als Chemotherapeutikum gegenüber malignen Tumoren eingesetzt wird, als Referenzsubstanz verwendet.

5.1 Diskussion des Wachstumsverhaltens und der Zelltoxizität

Die Versuche zum Wachstumsverhalten der KB-Zelle nach Gabe von DDP, TDC und VDC ergeben eindeutig, daß DDP und die hier untersuchten Metalloccen-dihalogenide bei der Behandlung von KB-Zellen konzentrationsabhängige wachstumshemmende Eigenschaften aufweisen. Bei der Dosis-Wirkungs-Beziehung ist auffällig, daß VDC gegenüber TDC eine wesentlich stärkere Wirkung hat.

In der niedrigsten Konzentrationsstufe von nur 10^{-6} M ist bei VDC bereits ein wachstumshemmender Effekt vorhanden. Wie in Abb.80 gezeigt, lag der zytostatische Effekt 72 Stunden nach Beendigung der Substanzexposition beim VDC mit 29 % im Gegensatz zu TDC und DDP im positiven Bereich. Die KB-Zellen wurden demnach nach Applikation der niedrigsten VDC-Konzentration stärker gehemmt als nach Zugabe der niedrigsten TDC- und DDP-Konzentration; nach Behandlung mit den geringstkonzentrierten Lösungen von TDC und DDP wuchsen sie sogar stärker als die Kontrollzellen. Im mittleren Konzentrationsbereich ist bei allen drei Substanzen eine etwa gleich hohe Wachstumshemmung zu erkennen, wobei die zytostatischen Effekte nach 72 Stunden bei Werten um

75 % lagen.

Der Vergleich zwischen den zytostatischen Effekten der untersuchten Substanzen wird durch die unterschiedlichen Konzentrationen erschwert. Die TDC-Lösung (5×10^{-4} M) erreichte ungefähr die gleiche Hemmleistung wie die 50mal niedriger konzentrierte VDC-Lösung (10^{-5} M). Eine ähnliche Hemmwirkung wurde vom DDP mit einer Konzentration (5×10^{-6} M) erreicht, die halb so groß ist wie die entsprechende VDC-Konzentration.

Unter der hypothetischen Annahme einer logarithmischen Abhängigkeit des zytostatischen Effektes von der Substanzkonzentration im Bereich zwischen niedrigster und mittlerer Konzentrationsstufe lassen sich die zytostatischen Effekte auf gleiche Konzentrationen interpolieren. Für eine 10^{-6} M DDP-Lösung könnte unter dieser Voraussetzung ein zytostatischer Effekt von etwa 10 % berechnet werden. VDC hatte bei dieser Konzentration einen zytostatischen Effekt von 29 %, wirkt somit etwa dreifach stärker. Gleiche zytostatische Effekte beider Substanzen wären bei einer Konzentration zu erwarten, die zwischen 2×10^{-6} M und 3×10^{-6} M liegt. Bei einer Lösungskonzentration von 5×10^{-6} M überwiegt der zytostatische Effekt von DDP mit 76 % dem interpolierten Effekt des VDC von etwa 60 %. Ein positiver zytostatischer Effekt von TDC ist erst bei einer Konzentration zu erwarten (etwa 10^{-4} M), bei der DDP und VDC schon Hemmwirkungen von 100 % zeigten. Ob bei der Betrachtung der Dosis-Wirkungs-Beziehung die Annahme einer logarithmischen Abhängigkeit richtig ist, läßt sich mit Hilfe dieser Arbeit nicht ableiten. Sie erscheint allerdings als Grundlage eines ersten Vergleichs zwischen den Substanzen plausibel. Endgültige Aussagen darüber könnten erst gemacht werden, wenn die Substanzen in kleineren Dosisschritten ausgetestet würden.

Diese gefundenen Resultate stehen mit den Ergebnissen in Einklang, die bei der Anwendung von TDC und VDC beim EAT

gefunden wurden. Vergleichbar mit den Ergebnissen von KÖPF-MAIER³¹, haben die beiden Metalloccen-dichloride auch bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Tumorzellen eine unterschiedliche in-vitro-Wirkintensität. Ob Unterschiede zwischen den Wirkungsmechanismen auf die beiden Tumorsysteme bestehen, läßt sich aus diesen Ergebnissen nicht mit Sicherheit ableiten, erscheint aber unwahrscheinlich. Die Beantwortung dieser Fragestellung muß weiterführenden Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Für den Avitalitätsindex ergaben sich sofort nach Ende der Substanzexposition in der niedrigsten und mittleren Konzentrationstufe Werte zwischen 15 % und 39 %. Die niedrige bzw. mittlere VDC-Konzentration ließ 15 % bzw. 23 % avitale Zellen entstehen und wies damit die niedrigste anfängliche Sterberate unter den drei getesteten Substanzen auf. VDC hatte auch bei den Untersuchungen von KÖPF-MAIER³¹ die anfänglich niedrigsten Avitalitätsindices. Die Sterberate stieg dann sowohl beim EAT als auch bei den KB-Zellen für VDC stärker an als für die beiden anderen Substanzen. Bei den KB-Zellen stand einem Avitalitätszuwachs von etwa 30 % für VDC eine Steigerung von etwa 5 % für DDP und 8 % bzw. 16 % für TDC gegenüber. Der Anstieg der Sterberate von TDC- und DDP-exponierten Zellen lag dem Zuwachs der Sterberate der Kontrollzellen wesentlich näher als der Avitalitätszuwachs der VDC-exponierten Zellen. Der Vorzug des VDC aufgrund des anfänglich geringeren Auftretens von stark geschädigten Zellen wurde somit durch die folgende hohe Sterberate wieder aufgehoben.

Das unterschiedliche Sterbeverhalten bei VDC-Gabe könnte mit einer geringeren Wirkgeschwindigkeit des VDC erklärt werden. Während bei den beiden anderen Substanzen der Avitalitätsindex sofort nach Substanzgabe auf einen hohen Wert anstieg und danach nur noch der natürlichen Sterberate entsprechend wuchs, trat beim VDC die substanzbedingte Steigerung verzögert auf.

**Zytostatischer Effekt
von
KB-Zellen
nach 72 Stunden Behandlung
mit DDP, TDC und VDC**

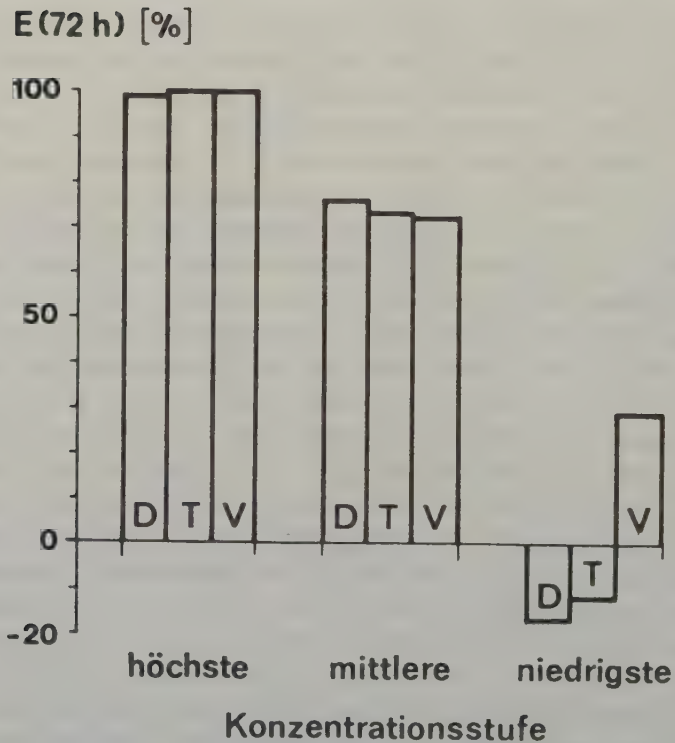


Abb. 80: Zytostatische Effekte 72h nach Beendigung der Substanzgabe für alle Konzentrationsstufen von DDP, TDC und VDC (D = DDP, T = TDC, V = VDC).

Bemerkenswert ist weiterhin, daß trotz der gegenüber den Kontrollzellen erhöhten Sterberate das Wachstum der KB-Zellen nach Gabe der niedrigsten Konzentration aller drei Substanzen dem der Kontrollzellen fast gleich, teilweise sogar besser war. Das gleichzeitige Auftreten einer hohen Sterberate und eines erhöhten Wachstums setzt das Vorhandensein eines kompensatorischen, reparativen Prozesses voraus, der durch die Zytostatikabehandlung ausgelöst wird. Das durch den hohen Anteil avitaler Zellen zu erwartende Absinken der Zellzahlen blieb teilweise völlig aus, so daß als kompensatorischer Effekt eine erhöhte Mitoseaktivität denkbar wäre. Dies steht im Einklang mit der in Tab.III aufgeführten lichtmikroskopischen Beobachtung der Erhöhung der Mitoseaktivität.

Nach Gabe der jeweils höchsten Substanzkonzentrationen war bei allen drei Substanzen kein Wachstumsanstieg zu verzeichnen (Abb.3a,4a,5a). Innerhalb von 72 Stunden fiel die Zellzahl nach Beendigung der Substanzgabe sogar stark ab. Vergleichend zu den Ergebnissen von KÖPF-MAIER ist festzustellen, daß die hochkonzentrierten Substanzlösungen an den EAT-Zellen nicht so stark wachstumshemmend wirkten: 72 Stunden nach Gabe einer 5×10^{-3} M TDC-Lösung stagnierte die EAT-Zellzahl und verblieb in der Größenordnung der eingesäten Zellanzahl. Ein kleiner Anstieg der Zellzahlen war 72 Stunden nach Gabe einer 10^{-4} M VDC-Lösung zu beobachten. Auch die Avitalitätsindices dieser beiden Substanzen bei höchster Konzentration lagen nach 72 Stunden mit 80 % für TDC und 95 % für VDC bei den EAT-Zellen niedriger als bei den KB-Zellen. Da die KB-Zellen in einer Monolayer, die EAT-Zellen dagegen in Suspension kultiviert wurden, ist ein Vergleich der Sterberaten erschwert. Der in der Monolayerkultur der KB-Zellen ermittelte Avitalitätsindex wird allerdings eher einen geringeren Wert annehmen als die in einer Suspensionskultur dieser Zellen gemessenen Sterberate, weil sich wahrscheinlich avitale Zellen aus der Monolayer herauslösen und damit nicht mehr im Avitalitätsindex berücksichtigen.

sichtigt werden. Somit scheinen die KB-Zellen etwas empfindlicher auf die applizierten Metalloccen-dichloride zu reagieren als die EAT-Zellen. Als Ursache für die Abnahme der gemessenen Zellzahlen bei den am höchsten konzentrierten Substanzlösungen läßt sich eine Abnahme der Haftkraft der KB-Zellen untereinander und an dem Kulturflaschenboden denken. Die wahrscheinlich kurz vor dem Zelltod stehenden Zellen lösen sich ab und stehen dann nicht mehr bei der Erfassung der Zellzahlen in der Monolayerkultur zur Verfügung.

Die Möglichkeit der verminderten Haftfähigkeit kann auch durch die elektronenmikroskopischen Befunde unterstützt werden. Wie in Abb.77 zu erkennen und in Kapitel 4.4.2 beschrieben, lösten sich bei späteren Untersuchungszeitpunkten die Zellmembranen vom Zytoplasma und verknäuelten sich ineinander. Der enge Zellkontakt untereinander wurde dadurch aufgelockert und auch teilweise völlig gelöst. Ebenso ist es denkbar, daß der Kontakt der Zellen zum Kulturflaschenboden aufgehoben war und sich die Zellzahlen auf der Monolayerkultur verringert haben, weil sich die abgelösten Zellen als Suspension im Nährmedium befanden. Aus den Befunden läßt sich weiter ablesen, daß TDC, VDC und DDP bei hoher Konzentration einen schnellen direkten zytotoxischen Effekt auf die KB-Zellen haben müssen, denn sofort nach Beendigung der Substanzexposition waren ca. 90 % der Zellen avital. Im Gegensatz dazu wurden von KÖPF-MAIER beim EAT nach der Gabe von VDC (10^{-4} M) und TDC (5×10^{-3} M) niedrigere Avitalitätsindices direkt nach Substanzgabe gefunden (TDC = 65 %, VDC = 35 %).

5.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen

5.2.1 Veränderungen des Kernes

Schon kurz nach Substanzentfernung konnten Kerninvaginationen beobachtet werden, die bei späteren Untersuchungs-

zeitpunkten über das Auftreten von Kernmembraneinstülpungen bis hin zur Mehrkernigkeit führten. Wie aus Tab.III ersichtlich, fielen die Riesenzellen im Lichtmikroskop 48 bis 72 Stunden nach der Gabe der Zytostatika auf. Ob es sich bei diesen Riesenzellen um echte mehrkernige Zellen handelte, läßt sich nicht eindeutig festlegen, da auch extrem gelappte Kerne vorgelegen haben könnten. Unterstützt wird diese Überlegung durch die gelegentlich auftretenden Karyoplasmabrücken, welche die Kerne noch untereinander verbanden. Mit Hilfe von Serienschritten zeigte SODHI⁴⁹ an mit DDP behandelten Sarcoma-180-Zellen, daß es sich nicht um echte mehrkernige Zellen handelte, sondern um Zellen mit stark segmentierten Kernen. Eine Übertragung von SODHIs Befunden auf die Kerne der KB-Zellen wäre denkbar.

Dem Auftreten dieser Zellen messen viele Autoren große Bedeutung zu, da sie glauben, daraus Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus ziehen zu können. KÖPF-MAIER^{27,28} ging auf mehrere Möglichkeiten ein. Eine Blockade des Kern-Stoffwechsels in der prämitotischen G₂-Phase sah sie als am wahrscheinlichsten an. Diese würde sich morphologisch in Form von Kernoberflächen-Vergrößerungen, Kernmembraneinstülpungen und der Ausbildung von Doppelmembransystemen manifestieren. Die postulierte G₂-Blockierung wäre auch für die KB-Zelle ein durchaus denkbarer Mechanismus, da alle angesprochenen Strukturveränderungen bei den KB-Zellen ebenfalls auftraten und teilweise stark ausgeprägt waren.

Daneben ließe sich die Entstehung von mehrkernigen Riesenzellen auch durch eine Veränderung an den Mikrotubuli und Mikrofilamenten erklären. Es wäre möglich, daß durch veränderte Mikrofilamente und Mikrotubuli - sie werden bei den KB-Zellen erst unter Zytostatikabehandlung sichtbar - die Zytokinese nach der Kernteilung gehemmt wird und eine Schädigung des Zytoskeletts erfolgt. AGGARWAL⁵ bringt damit das auch bei den KB-Zellen auftretende Phänomen der

zonalen Gliederung der Zelle mit kreisförmiger Anordnung der Zellorganellen um den Kern in engen Zusammenhang.

Das vielfältige Bild 48 bis 72 Stunden nach Beendigung der Substanzexposition deutet auf mehrere Störungen im Ablauf des normalen Zellzyklus hin. Im Laufe der Untersuchungszeitpunkte verändert sich die Kernstruktur oft: Neben der Auflösung der normalen Nucleolusstruktur ist die Schwankung im Ausmaß der Heterochromatinablagerung auffällig. Am Anfang und am Ende der Untersuchungszeitpunkte waren Chromatinablagerungen sichtbar, dagegen war nach Gabe von VDC und TDC bei den mittleren Untersuchungszeitpunkten ein fast klares, transparentes Karyoplasma ohne jegliche Chromatinverdichtungen zu erkennen. Die Zytostatika haben also eine erhebliche Wirkung auf die Kernmorphologie, wobei eventuell eine leichte vorübergehende Erholungsphase bei den mittleren Zeitwerten möglich erscheint. Darüber hinaus stehen auch die Nucleolusveränderungen in Einklang mit einem direkten DNA-Angriff der Zytostatika, der für DDP aufgrund biochemischer Studien schon von MUNCHAUSEN und RAHN⁴² sowie von ROOS⁴⁸ als "intrastand cross-links" innerhalb gleicher DNA-Stränge beschrieben wurde. Diese bifunktionellen Verbrückungen innerhalb gleicher DNA-Stränge und die damit auftretenden Störungen im DNA-Stoffwechsel sind als Ursache für die morphologischen Veränderungen nach VDC- und TDC-Gabe wahrscheinlich.

5.2.2 Veränderungen der Mitochondrien

Die Veränderungen an den Mitochondrien traten nach Gabe aller drei Substanzen auffällig und deutlich in Erscheinung. Schon bei früheren Untersuchungszeitpunkten vergrößerten sich die Mitochondrien und nahmen eine unregelmäßige Gestalt an. Die bei der unbehandelten Zelle kaum sichtbaren Cristae mitochondriales wurden manchmal bei späteren Untersuchungszeitpunkten deutlich sichtbar. Neben

den teilweise starken Formveränderungen war auch später die Anzahl der Mitochondrien erhöht. Das Ansteigen der Mitochondrienzahl war bei allen Substanzen zu verzeichnen, hing jedoch von der applizierten Substanzkonzentration ab.

KÖPF-MAIER^{30, 31} beobachtete auch an den Mitochondrien der EAT-Zellen eine quantitative Veränderung nach Metallocten-dihalogenid-Gabe in vivo und interpretierte dies als Ausdruck einer Intensivierung von bestimmten Stoffwechselprozessen, insbesondere Prozessen der Proteinbiosynthese ("unbalanced cell growth").

Die ultrastrukturellen Veränderungen wurden von SODHI⁵³⁻⁵⁶ und AGGARWAL^{3, 4} in ähnlicher Weise für DDP beschrieben. AGGARWAL und SODHI glauben, daß die Veränderungen durch einen direkten zytotoxischen Effekt hervorgerufen werden, der zu degenerativen Umwandlungen der Mitochondrien führt. Die Quellung könnte durch eine verstärkte Wassereinlagerung hervorgerufen und die Veränderungen an den Cristae mitochondriales als Folge der Degeneration im mitochondrialen Stoffwechsel interpretiert werden.

Bei der Klärung der Ursache für die starken quantitativen und qualitativen Veränderungen der Mitochondrien ist es wichtig, sich die Aufgabe der Mitochondrien als Ort vielfältiger spezifischer zellulärer Funktionen vor Augen zu führen. Als "geordnetes Multienzymsystem" sind sie Träger der Enzyme des Zitratzyklus und des Fettsäurenabbaus sowie der biologischen Oxidation und der oxidativen Phosphorylierung. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Energiegewinnung durch Bereitstellung von ATP (LÖFFLER et al.³⁸). Eine Erhöhung des Energiebedarfes einer Zelle infolge einer Leistungssteigerung - z.B. aufgrund einer erhöhten Mitoseaktivität - wird im allgemeinen durch die reversible Aufweitung des Spaltraumes zwischen den Membranen der Cristae mitochondriales, die dadurch eventuell elektronenoptisch sichtbar werden, beantwortet. Weiterhin kann es auch zu einer Vermehrung der Mitochondrien durch Querteilung kom-

men (SCHIEBLER, SCHMIDT⁵²)

Das Ansteigen der Mitochondrienzahl könnte also als Reaktion auf den erhöhten Energiebedarf verstanden werden. Daneben wäre es jedoch auch denkbar, daß aufgrund der schon kurz nach Substanzeinwirkung veränderten Mitochondrien die Stoffwechselleistung des einzelnen Mitochondriums abgesunken ist und die Erhöhung der Mitochondrienanzahl einen kompensatorischen, reparativen Prozeß darstellt.

Neben den Enzymen beinhalten die Mitochondrien auch eine eigene DNA in ringförmiger Anordnung und eine RNA in Form ribosomenähnlicher Granula. Das spricht dafür, daß die Mitochondrien über eine gewisse Selbständigkeit verfügen. Durch das Vorhandensein von DNA und RNA wäre es somit denkbar, daß die Veränderungen in den Mitochondrien, ähnlich denen im Kern, auf einen direkten Angriff der Zytostatika auf die mitochondriale DNA zurückzuführen sind.

5.2.3 Auftreten von Mikrotubuli

Mikrotubuli waren bei der unbehandelten KB-Zelle nicht sichtbar, jedoch traten sie 12 bis 24 Stunden nach Substanzeinwirkung aller drei getesteten Zytostatika auf.

BENNINGHOFF und GOERTTLER⁹ beschreiben, daß sich Mikrotubuli auch in vitro aus dem Protein Tubulin aggregieren können ("assembly"). Es wird angenommen, daß im Zytoplasma die aus Polyribosomen synthetisierten Tubulinuntereinheiten in einem Pool vorliegen, der sich mit den formierten Mikrotubuli in einem - wahrscheinlich vom Ca-Ionen-Vorrat der Zelle abhängigen - dynamischen Gleichgewicht befindet. Wird dieses verschoben, kommt es zur Organisation neuer oder zur Disaggregation ("disassembly") bereits vorhandener Mikrotubuli. Es wäre denkbar, daß die Zytostatika in dieses Gleichgewicht eingreifen und es dann

zur morphologisch sichtbaren Bildung von Mikrotubuli kommt.

5.2.4 Veränderungen am rauen endoplasmatischen Retikulum

Die Veränderungen am rER variierten konzentrations- und substanzabhängig. Nach Gabe von VDC und TDC war 12 Stunden nach Substanzentfernung kaum rER vorhanden. Nach VDC-Gabe waren bei den mittleren Zeitwerten längere Zisternenabschnitte zu beobachten, die sich dann später wieder verkürzten. Beim TDC fielen längere, parallelverlaufende Abschnitte erst 3 Tage nach Substanzentfernung auf. Beim DDP waren anfänglich sofort gehäuft kürzere, teilweise verbreiterte Zisternenabschnitte vorhanden, deren Anzahl 1 Tag nach Expositionsende wieder stark abnahm.

AGGARWAL^{2, 3} und SODHI⁵⁴⁻⁵⁶ sehen die Abnahme des rER als Indiz für degenerative Zellveränderungen und der Abnahme des Stoffwechsels an. Grundsätzlich verfügt die unbehandelte KB-Zelle über ein gering ausgeprägtes rER. Die Schwankungen im Auftreten des rER sind schwierig zu interpretieren. DDP und den Metalloiden-dihalogeniden müssen unterschiedliche, den Proteinstoffwechsel beeinflussende Wirkungen auf die KB-Zellen zugeschrieben werden. Das DDP wirkte anfänglich eher stimulierend auf die Bildung des rER; jedoch schien später eine Erschöpfung einzutreten.

Bei VDC und TDC trat eine erhöhte rER-Bildung erst später auf. Aus den Befunden ist nicht zu klären, ob die Substanzen eine unmittelbare Wirkung auf die Bausteine des rER haben oder ob die veränderte rER-Bildung Folge einer Reaktionskette ist, die von einer beeinflussten Stoffwechsellage des Kernes und einem verschobenen Gleichgewicht im Proteinstoffwechsel ausgeht.

5.2.5 Auftreten von virusähnlichen Partikeln

Nach der Behandlung mit VDC und TDC traten im Zytoplasma bei den KB-Zellen helle Bezirke auf, die durch eine feine, elektronendichte Membran gegen das übrige Zytoplasma abgegrenzt waren. In diesen Räumen befanden sich kleine, teilweise ohne exakte geometrische Anordnung aneinandergelagerte, oval gestaltete virusähnliche Partikel mit einem Durchmesser von 20-30 nm Größe. Da diese virusähnlichen Partikel ausschließlich nach Behandlung mit VDC und TDC auftraten und nie in den Kontrollzellen beobachtet werden konnten, ist anzunehmen, daß ihre morphologische Expression durch die Metalloccen-dichlorid-Applikation induziert wurde. In diesem Zusammenhang ist weiterhin hervorzuheben, daß ein analoges Auftreten von virusähnlichen Partikeln in KB-Zellen nach DDP-Gabe nicht beobachtet werden konnte. Das Phänomen der Virusinduktion wurde schon nach Behandlung mit DDP von SODHI⁵⁴ und nach Gabe von TDC von KÜPF-MAIER^{30, 31} beschrieben. Der von SODHI bei Sarcoma-180-Tumorzellen beschriebene Virus vom Polyomatyp war 48 nm groß und wurde bereits bei unbehandelten Zellen im Nucleolus, nach DDP-Applikation "extrazellulär" in der Nähe der degenerierten Zellen beobachtet. Dieser Virustyp wies ein geordnetes, geometrisches Muster auf.

Die von KÜPF-MAIER beschriebenen 60-80 nm großen Partikel erinnern an intrazytoplasmatische Viren vom Typ A. Es ist anzunehmen, daß in EAT-Zellen Viren vorhanden sind, die im unbehandelten Zustand nicht exprimiert sind, jedoch unter Behandlung im Zytoplasma in Erscheinung treten und eventuell eine virusbedingte antigene Oberflächenveränderung bewirken. Ähnliches wurde auch von AARONSON et al.¹ und LOWY³⁹ nach Gabe von 5-Bromo- und 5-Jododeoxyuridin-Verbindungen beschrieben.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen von KÜPF-MAIER^{30, 32}

und SODHI⁵⁴ traten keine offensichtlichen, auf Virusbildung zurückzuführenden Vorgänge im Nucleus auf. Bei den virusähnlichen Partikeln in den KB-Zellen könnte es sich um Viren des zytoplasmatischen Typs handeln, wie sie von BERNARD¹¹ beschrieben wurden. Dabei waren die Viren meistens von einer einfachen Membran eingeschlossen. BERNARD beschrieb auch, daß bestimmte Hühnerviren in Mitochondrien bzw. ihren Vorgängern entstehen und in das Zytoplasma abgegeben werden. Ob dieser Mechanismus auch mit den in den KB-Zellen auftretenden Vorgängen in Zusammenhang steht, läßt sich aus den vorliegenden Befunden nicht ableiten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals überprüft, ob neben dem in der Klinik bereits verwendeten anorganischen cis-Diammindichloroplatin(II) (DDP) andere metallorganische Komplexe vom Typ der Metallocen-dichloride zytostatische Eigenschaften gegenüber einer humanen Tumorzelllinie aufweisen.

Die Untersuchungen erfolgten an einem seit vielen Jahren etablierten Tumorzellstamm, der KB-Tumorzelllinie, wobei es sich ursprünglich um Biopsiematerial eines oralen Epidermoidkarzinoms handelte.

In einer Monolayerkultur wurden die Zellen 90 Minuten lang verschiedenen Konzentrationen von Vanadocen-dichlorid (VDC), Titanocen-dichlorid (TDC) und DDP als Referenzsubstanz ausgesetzt. Der wachstumshemmende Effekt wurde mit Hilfe von Wachstumsreihen und der Bestimmung der Avitalitätsindices ermittelt. Zur Darstellung der zellulären Veränderungen wurden für unterschiedliche Konzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Substanzentfernung sowohl licht- als auch elektronenmikroskopische Präparate angefertigt.

Die Wachstumsreihen zeigten, daß alle drei Substanzen VDC, TDC und DDP konzentrationsabhängig zytostatisch wirksam sind: Das Wachstum der KB-Zellen wird von TDC erst durch eine Konzentration von 5×10^{-4} M, dagegen von VDC schon durch eine 10^{-6} -molare Lösung gehemmt. Im Vergleich dazu hemmt DDP das Wachstum bei einer Konzentration von 5×10^{-6} M.

Bei sehr hoch konzentrierter Lösung (VDC: 10^{-4} M, TDC: 5×10^{-3} M, DDP: 5×10^{-5} M) war festzustellen, daß fast 100 % der Zellen avital wurden. Auch bei niedrigen Konzentrationen (VDC: 10^{-6} M, TDC: 5×10^{-5} M, DDP: 5×10^{-7} M) war sofort nach Beendigung der Substanzexposition eine

verhältnismäßig hohe Sterberate zu beobachten, 15 % bis 30 % der Zellen waren avital.

Lichtmikroskopisch fiel der sofortige Anstieg der Mitoseaktivität mit besonders vermehrtem Auftreten von Ana- und Metaphasen auf. 24 Stunden nach Beendigung der Substanzgabe traten viele verschieden gestaltete Mitoseanomalien in Erscheinung, wobei nach 48 Stunden der Mitoseindex wieder auf Normalwerte zurückging. Später waren Kerneinschnürungen, Vakuolen im Zytoplasma, Chromatinklumpungen und das Auftreten von ein- und zweikernigen Riesenzellen auffällig.

Im Zytoplasma zeigte sich im elektronenmikroskopischen Bild bei früheren Untersuchungszeitpunkten ein Aufquellen der Mitochondrien, dem eine zahlenmäßige Zunahme der Mitochondrien folgte. Es entwickelten sich Mikrotubuli, und die ursprünglich geringe Ausprägung des rER unterlag unregelmäßigen Schwankungen. Weiterhin waren nach Gabe von VDC und TDC im Zytoplasma membranumgrenzte Räume mit virusähnlichen Partikeln zu beobachten. 72 Stunden nach Substanzgabe waren besonders nach DDP- und TDC-Gabe stark degenerierte Zellen mit großen Vakuolen, Fett- und Glykogeneinlagerungen zu erkennen.

Der Kern wies sofort nach Beendigung der Substanzgabe Kerninvaginationen und Chromatinklumpungen auf, die sich teilweise späterhin wieder verringerten. Die Struktur der Nucleoli lockerte sich, die Pars-amorpha-Bezirke waren nicht mehr klar abgegrenzt. Manchmal ließen sich intranucleäre Doppelmembranausläufer erkennen. Bei späteren Untersuchungszeitpunkten verschob sich das Kern-Zytoplasma-Verhältnis zugunsten des Kerns; ein- und zweikernige Riesenzellen waren vorhanden.

Aufgrund anderer Untersuchungen ist anzunehmen, daß der primäre Angriffspunkt der drei getesteten Zytostatika die DNA des Kernes ist. Die morphologischen Veränderungen der

Zellen werden wahrscheinlich durch den Substanzangriff an der DNA und die Blockierung vieler Zellen in der G₂-Phase hervorgerufen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. AARONSON S.A., TODARO, G.J., SCOLNICK, E.M., Induction of murine C-type viruses from clonal lines of virus-free BALB/3T3 cells. *Science* 174 (1971) 157-159
2. AGGARWAL, S.K., SODHI, A., Cytotoxic effects of cis-dichlor-diammineplatinum(II) on the mammalian cell in vitro. A fine structural study, *Cytobiologie* 7 (1973) 366-374.
3. AGGARWAL, S.K., Inhibition of cytokinesis in mammalian cells by cis-dichlorodiammine-platinum(II), *Cytobiologie* 8 (1974) 395-402.
4. AGGARWAL, S.K., OFOSU, G.A., WAKU, Y., Cytotoxic effects of Platinum-pyrimidine complexes on the mammalian cells in vitro: A fine structural study, *J. Clin. Hematol. Oncol.* 7 (1977) 547-561
5. AGGARWAL, S.K., Fine structural studies using platinum coordination complexes, *J. Clin. Hematol. Oncol.* 7 (1977) 760-796.
6. BARILE, M., Protocol for the staining procedure, using Bisbenzamide Fluorochrome stain, Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, Maryland, USA.
7. BECK, D.J., BRUBAKER, R.R., Mutagenic properties of cis-platinum (II) diamminodichloride in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.* 27 (1975) 181-189.
8. BECK, D.J., FISCH, J.E., Mutagenicity of platinum coordination complexes in *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.* 77 (1980) 45-54.
9. BENNINGHOFF, A., GOERTTLER, K., *Lehrbuch der Anatomie des Menschen*, Urban & Schwarzenberg, München 1978, 87-89
10. BERGERAT, J.P., GREEN, C., DREWINKO, B., Combination chemotherapy in vitro. IV. Response of human colon carcinoma cells to combinations using cis-diamminedichloroplatinum, *Cancer Biochem. Biophys.* 3 (1979) 173-180.

11. BERNARD, W., The Detection and Study of Tumor Viruses with the Electron Microscope, Cancer Research 20 (1960) 712-726.
12. BERNARD, W., Ultrastructural aspects of the normal and pathological nucleolus in mammalian cells, Natl. Cancer Inst. Monogr. 23 (1966) 13-38.
13. EAGLE, H., Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89 (1955) 362-364.
14. FAWCETT, D.W., Atlas zur Elektronenmikroskopie der Zelle, Urban und Schwarzenberg, München, 1973.
15. HEINEN, E., BASSLEER, R., Mode of action of cis-dichloro-diammine-platinum(II) in mouse Ehrlich ascites tumour cells, Biochem. Pharmacol. 25 (1976) 1871-1875.
16. HEINEN, E., BASSLEER, R., Cytological and cytochemical analysis of the effects of cis-dichloro-diammino platinum(II) in chick fibroblasts cultivated in vitro. Chemother. 22 (1976) 253-261.
17. HOLMBERG, B., On the permeability to lissamine green and other dyes in the cause of all injury and all death, Exp. Cell Res. 22 (1961) 406-414.
18. IARC Working Group, IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some antineoplastic and immunosuppressive agents. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 26 (1981) 151.
19. KÜPF, H., KÜPF-MAIER, P., Titanocen-dichlorid - das erste Metallocen mit cancerostatischer Wirksamkeit, Angew. Chem. 91 (1979) 509.
20. KÜPF-MAIER, P., KÜPF, H., Vanadocen-dichlorid - ein weiteres Antitumor-Agens aus der Metallocen-reihe, Z. Naturforsch. 34 (1979) 805-807.
21. KÜPF-MAIER, P., KÜPF, H., LEITNER, M., VOIGTLÄNDER, R., Molybdocen-dichlorid als Antitumor-Agens, Z. Naturforsch. 34 (1979) 1174-1176.
22. KÜPF-MAIER, P., HESSE, B., KÜPF, H., Tumورهemmung durch Metallocene: Wirkung von Titanocen-, Zirconocen- und Hafnocen-dichlorid gegenüber Ehrlich-Aszites-Tumor der Maus, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 96 (1980) 43-51.

23. KÜPF-MAIER, P., KÜPF, H., Tumor inhibition by titanocene dichloride: First clues to the mechanism of action, *Naturwissenschaften* 67 (1980) 415-416.
24. KÜPF-MAIER, P., HESSE, B., VOIGTLÄNDER, R., KÜPF, H., Tumor inhibition by metallocenes: Antitumor activity of titanocene dihalides $(C_5H_5)_2TiX_2$ ($X = F, Cl, Br, I, NCS$) and their application in buffered solutions as a method for suppressing drug-induced side effects, *J. Cancer Res. Clin. Oncol* 97 (1980) 31-39.
25. KÜPF-MAIER, P., LEITNER, M., KÜPF, H., Tumor inhibition by metallocenes: Antitumor activity of niobocene and tungstocene-dichlorides, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 42 (1980) 1789.
26. KÜPF-MAIER, P., KAHL, W., KLOURAS, N., HERMANN, G., KÜPF, H., Tumorerhellung durch Metallocene: Ringsubstituierte und ringüberbrückte Titanocendichloride, *Eur. J. Med. Chem.* 16 (1981) 275-281.
27. KÜPF-MAIER, P., WAGNER, W., HESSE, B., KÜPF, H., Tumor inhibition by metallocenes: Activity against leukemias and detection of the systemic effect, *Eur. J. Cancer* 17 (1981) 665-669.
28. KÜPF-MAIER, P., WAGNER, W., Köpf, H., In vitro cell growth inhibition by metallocene dichlorides, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 5 (1981) 237-241.
29. KÜPF, H., KÜPF-MAIER, P., Metallocendihalogenide als potentielle Cytostatika, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 29 (1981) 154-156.
30. KÜPF-MAIER, P., WAGNER, W., Morphologische Aspekte der Tumorerhellung durch Metallocendihalogenide, 75. Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft (1981) 567-569.
31. KÜPF-MAIER, P., WAGNER, W., LISS, E., Cytokinetic behavior of Ehrlich ascites tumor after in vivo treatment with cis-diamminedichloroplatinum(II) and metallocene dichlorides, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 102 (1981) 21-30.
32. KÜPF-MAIER, P. Development of necroses, virus activation and giant cell formation after treatment of Ehrlich ascites tumor with metallocene dichlorides, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 103 (1982) 145-164.

33. KÖPF-MAIER, P., KRAHL, D., In vitro treatment with metallocene dichlorides: Determination of the intracellular distribution of the metal atoms by use of the electron energy loss spectroscopy. In: Neubert, D., Merker, H.J. (Hrsg.), Applicability of culture techniques for studies on prenatal differentiation and toxicity, Walter de Gruyter, Berlin, 1982.
34. KUMEGAWA, M., CATTONI, M., and ROSE, G.G., Electron microscopy of oral cells in vitro I - Annulate lamellae observed in strain KB cells, J. Cell Biol. 34 (1967) 897-901.
35. KUMEGAWA, M., CATTONI, M., and ROSE, G.G., Electron microscopy of oral cells in vitro II - Subsurface and intracytoplasmic confronting cisternae in strain KB cells, J. Cell Biol. 36 (1968) 443-452.
36. LANE, N.J., and NOVIKOFF, A.B., Effects of arginine deprivation, ultraviolet radiation and X-radiation on cultured KB cells: A cytochemical and ultrastructural study, J. Cell Biol. 27 (1965) 603-620.
37. LAPIS, K., and BERNARD, W., The effect of mitomycin C on the nucleolar fine structure of KB-cells in cell culture, Cancer Res. 25 (1965) 628-645.
38. LÜFFLER, G., PERTIDES, P.E., Weiss, L., HARPER, H.A., Physiologische Chemie, Springer-Verlag, Berlin, 1979, 150-151.
39. LOWY, D.R., ROWE, W.P., TEICH, N., HARTLEY, J.W., Murine leukemia virus: High-frequency activation in vitro by 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine, Science 174 (1971) 155-156.
40. MANAKA, R.C., and WOLF, W., Distribution of cis-platin in blood, Chem. Biol. Interactions 22 (1978) 353-358.
41. MONTI-BRAGADIN, C., TAMARO, M., BANFI, E., Mutagenic activity of platinum and ruthenium complexes, Chem. Biol. Interact. 11 (1975) 469-472.
42. MUNCHHAUSEN, L.L., RAHN, R.O., Biology effects of cis-Dichlorodiammineplatinum(II) (NSC-119875) on DNA. Cancer Chemother. Rep. 59 (1975) 643-646.

43. NEUMANN, W., BECHMANN, G., Der Einsatz von LAB-TEK-Zellkultur-Objektträgern in der virologischen Laboratoriumsdiagnostik, Dtsch. tierärztliche Wschr. 87 (1980) 408-409.
44. PEYRONE, M., Ober die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorüre, Ann. Chem. 51 (1844) 1-29.
45. PHILLIPS, D.M., and PHILLIPS, S.G., Distinctive characteristics of nucleoli of two established cell lines, J. Cell. Biol. 49 (1971) 803-815.
46. REYNOLDS, E.S., The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, J. Cell Biol. 17 (1963) 208-212.
47. RIBAUD, P., GOUVEIA, J., BONNAY, M. and MATHE, G., Clinical pharmacology and pharmacokinetics of cis-platinum and analogs, Cancer Treat. Rep. 65 (Suppl. 3) (1981) 97-105.
48. ROOS, I.A.G., The interaction of an anti-tumour platinum complex with DNA, Chem. Biol. Interact 16 (1977) 39-55.
49. ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., KRIGAS, T., Inhibition of cell division in Escherichia Coli by electrolysis products from a platinum electrode, Nature 205 (1965) 698.
50. ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., TROSKO, J.E., Platinum compounds: A new class of potent antitumor agents, Nature (Lond) 222 (1969) 385-386.
51. ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., The successful regression of large solid sarcoma-180 tumors by platinum compounds, Cancer Research 30 (1970) 1799-1802.
52. SCHIEBLER, T.H., SCHMIDT, W. (Hrsg.), Lehrbuch der Anatomie des Menschen, Springer-Verlag, Berlin, 1981, 11-12.
53. SODHI, A., AGGARWAL, S.K., Effekts of cis-dichloro-diammine-platinum(II) in the regression of sarcoma-180: A fine structural study, J. Natl. Cancer Inst. 53 (1974) 85-101.
52. SODHI, A., Ultrastructural changes of sarcoma-180 cells after treatment with cis-dichloro-diammineplatinum(II), in vivo & in vitro, Indian Journal of Experimental Biology 14 (1976) 383-390.

55. SODHI, A., Origin of giant cells in regressing sarcoma-180 after cis-dichlorodiammine Platinum(II) treatment: A fine structural study, *J. Clin. Hematol. Oncol.* 7 (1977) 569-579.
56. SODHI, A., SARNA, S., Ultrastructural Observations on the effect of cis-dichlorodiammine Platinum(II) on the cells of fibrosarcoma in swiss white mice, *Indian Journal of Experimental Biology* 17 (1979) 1-8.
57. STEWART, D.J., BENJAMIN, R.S., LUNA, M., FEUN, L., CAPRIOLI, R., SEIFERT, W., LOO, T.L., Human tissue distribution of platinum after cis-diamminedichloroplatinum, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 10 (1982) 51-54.
58. WELLHÖRNER, H.-H., -Cisplatin- allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie, Springer-Verlag, Berlin, 1982, 400-401.
59. WILKINSON, G., BIRMINGHAM, J. M., Bis-cyclopentadienyl compounds of Ti, Zr, V, Nb and Ta, *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 4281-4284.
60. WITSHAW, E., KRONER, T., Phase II study of cis-dichlorodiammineplatinum(II) (NSC-119875) in advanced adenocarcinoma of the ovary, *Cancer Treat. Rep.* 60 (1976) 55-60.
61. ZWELLING, L. A., KOHN, K.W., Mechanism of action of cis-Dichlorodiammineplatinum(II), *Cancer Treat. Rep.* 63 (1979) 1439-1444.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt

Frau Privat-Dozentin Dr. Petra Köpf-Maier

für die Überlassung des Themas sowie für ihre wertvolle Unterstützung bei der Planung der Versuche. Während der Versuchsdurchführung stand sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Sie förderte durch das mir freundlich gewährte Interesse und durch klärende Diskussionen das Zustandekommen dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich gleichermaßen Frau Greiff, Frau Lange und Frau Klein-Gabski für ihre stete Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung der technischen Arbeiten.

LEBENS LAUF

Name	Nitschke, Ina	
Geburtsdatum	09. März 1959	
Geburtsort	Berlin	
Mutter	Nitschke, Inge geb. Paschke Zahntechnikermeisterin	
Vater	Nitschke, Günter Zahntechnikermeister	
Schul Ausbildung	1965 - 1971	Grundschule am Sandsteinweg Berlin-Neukölln
	1971 - 1977	Askanische Oberschule Berlin-Tempelhof
	Mai 1977	Abitur
Berufsausbildung	1977 - 1980	Ausbildung zum Zahntechniker
	ab SS 1978	Studium der Zahnheilkunde an der Freien Universität Berlin
	1979	naturwissenschaftliche Vorprüfung (sehr gut)
	1980	Gesellenprüfung im Zahn- technikerhandwerk, zahnärztliche Vorprüfung (sehr gut)
	August 1983	zahnärztliche Prüfung (sehr gut) und Approbation als Zahnärztin, dann Tätigkeit als Assisten- tin in zahnärztlicher Praxis
	ab April 1984	Tätigkeit als wissenschaft- liche Mitarbeiterin in der Zahnklinik Berlin-Nord

